



Katylene Soraia Pereira Lima

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

**Avaliação da Actividade Antioxidante e
Antimutagénica em Diferentes Infusões
Medicinais: Barbas de milho, Carqueja, Dente de
Leão, Folhas de Oliveira e Urtiga-Branca**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Vogais: Prof. Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves

Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



[Setembro de 2011]



Katelene Soraia Pereira Lima

Licenciatura em Biologia Celular e Molecular

**Avaliação da Actividade Antioxidante e
Antimutagénica em Diferentes Infusões
Medicinais: Barbas de milho, Carqueja, Dente de
Leão, Folhas de Oliveira e Urtiga-Branca**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Vogais: Prof. Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves
Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

[Setembro de 2011]

Indicação de Direitos de Cópia ou Copyright - Katelene Soraia Pereira Lima

***Dissertação para obtenção de grau de mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar
Avaliação da Actividade Antioxidante e Antimutagénica em diferentes infusões medicinais:
Barbas de Milho, Carqueja, Dente de Leão, Folhas de Oliveira e Urtiga-Branca***

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpetuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

A Professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora deste Mestrado, por me ter proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho.

A Professora Doutora Maria Paula Duarte pela excelente orientação científica e dedicação que prestou ao trabalho desenvolvido, pelo excelente apoio e ainda pela total disponibilidade que demonstrou ao longo deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Rueff, director do Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, por ter disponibilizado as instalações e os equipamentos necessários à realização do ensaio ORAC.

A minha colega Verónica Fernandes por toda a ajuda, colaboração, apoio e ainda pela sua presença amiga na realização deste trabalho.

A Sara pela sua boa disposição e pela grande ajuda prestada no laboratório durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais Antónia Lima e João Pedro Lima por todo o apoio, força, amor e por terem sempre acreditado em mim.

Aos meus irmãos, especialmente à Eneida Lima pelo apoio, dedicação e amor.

A todos os meus amigos, especialmente a Josina e a Josiane Gomes, ao Ivan Sabino e ao Miguel Rodrigues pela sua presença amiga, encorajadora, pelos bons momentos passados e pelo excelente apoio moral.

Resumo

Recentemente, os antioxidantes exógenos introduzidos através de dieta ou por outros meios tornaram-se populares. Tem havido um crescente interesse na identificação de possíveis antioxidantes dietéticos capazes de tratar ou prevenir doenças causadas por radicais livres.

O objectivo deste trabalho foi o de contribuir para um melhor conhecimento das propriedades bioactivas de cinco infusões de plantas medicinais de consumo comum em Portugal, nomeadamente as infusões de carqueja (*Pterospartum tridentatum*), dente de leão (*Taraxacum officinale*), barbas de milho (*Zea mays*), folhas de oliveira (*Olea europaea*) e urtiga-branca (*Lamium album*). Para isso determinou-se o seu conteúdo em compostos fenólicos totais e em flavonóides totais e avaliou-se a capacidade antioxidante e antimutagénica destas infusões. Assim, a capacidade para inibir os efeitos mutagénicos do tert-butil hidroperóxido foi utilizada para avaliar a actividade antimutagénica, enquanto que a actividade antioxidante foi avaliada utilizando diferentes tipos de ensaios, nomeadamente ensaios de avaliação da actividade redutora (FRAP e CUPRAC), de quelacção de Fe(II) e de sequestro dos radicais hidroxilo, anião superóxido e peróxido.

Os resultados mostraram que todas as infusões em estudo possuem capacidade antioxidante (detectada através dos ensaios de capacidade redutora e de sequestro de ROS), e, com excepção da infusão de folhas de oliveira (*Olea europaea*), actividade antimutagénica. A infusão de carqueja (*Pterospartum tridentatum*) foi a que apresentou maior teor em fenóis e flavonóides e a que mais se destacou na maioria dos ensaios de actividade antioxidante que envolvem capacidade redutora ou capacidade de sequestro de ROS, sugerindo o envolvimento destes compostos neste tipo de actividade antioxidante. Contudo, esta infusão apresentou uma menor actividade antimutagénica que as infusões de dente de leão (*Taraxacum officinale*), barbas de milho (*Zea mays*) e urtiga-branca (*Lamium album*), sugerindo, assim, que a actividade antimutagénica resulte da acção de outra, ou de outras, classes de compostos para além dos compostos fenólicos.

Palavras-chave: Plantas medicinais, Infusões, Actividade antioxidante, Actividade antimutagénica, Compostos fenólicos

Abstract

Recently, exogenous antioxidants introduced through diet or by other means have become popular. There has been a growing interest in identifying potential dietary antioxidants that can prevent or treat diseases caused by free radicals.

The aim of this study was to contribute to a better understanding of the bioactive properties of five herbal infusions of common use in Portugal, namely the infusion of “carqueja” (*Pterospartum tridentatum*), dandelion (*Taraxacum officinale*), maize (corn) stigmas (*Zea mays*), olive leaves (*Olea europaea*) and white deadnettle (*Lamium album*). For this we determined the content of total phenolics and total flavonoids and evaluated the antimutagenic and antioxidant capacity of these infusions. Thus, the ability to inhibit the mutagenic effects of the tert-butyl hydroperoxide was used to evaluate the antimutagenic activity, while the antioxidant activity was evaluated using different types of tests, including tests to assess the reduction activity (FRAP and CUPRAC), chelation of Fe(II) and scavenge of hydroxyl radicals, superoxide anion and peroxy.

The results showed that all study infusions have antioxidant capacity (detected by the test of reduction capacity and scavenge of ROS), and, except for the infusion of olive leaves (*Olea europaea*), antimutagenic activity. The infusion of “carqueja” (*Pterospartum tridentatum*) presented the highest content of phenols and flavonoids and stood out in most antioxidant activity trials involving reduction capacity or scavenging capacity of ROS, suggesting the involvement of these compounds in this type of antioxidant activity. However, this infusion had a lower antimutagenic activity than infusions of dandelion (*Taraxacum officinale*), maize (corn) stigmas (*Zea mays*) and white deadnettle (*Lamium album*), thus suggesting that the antimutagenic activity results from the action of another or other classes of compounds besides phenolics compounds

Keywords: Medicinal plants, Infusions, Antioxidant activity, Antimutagenic activity, Phenolic compounds

Índice

Introdução	1
1 Plantas Medicinais, Alimentos Funcionais e Nutracêuticos.....	3
1.1 Caracterização das plantas medicinais estudadas.....	5
1.1.1 Carqueja	5
1.1.2 Dente de Leão.....	6
1.1.3 Milho	7
1.1.4 Oliveira.....	8
1.1.5 Urtiga-branca.....	10
2 Antioxidantes e “Stress” Oxidativo.....	12
2.1 Espécies reactivas de oxigénio	13
2.1.1. Anião superóxido	14
2.1.2 Radical hidroxilo	15
2.1.3 Radical peroxilo	15
2.1.4 Oxigénio singleto	15
2.1.5 Peróxido de Hidrogénio	16
2.1.6 Fontes exógenas de espécies reactivas de oxigénio	16
2.1.7 Interação das espécies reactivas de oxigénio com os lípidos	17
2.1.8 Interação das espécies reactivas de oxigénio com o DNA	18
2.1.9 Interação das espécies reactivas de oxigénio com as proteínas	18
2.2 Antioxidantes: Mecanismos de defesa contra o “stress” oxidativo.....	19
2.2.1 Defesas endógenas	19
2.2.2. Antioxidantes exógenos	21
2.3 A alimentação como fonte de compostos mutagénicos e carcinogénicos	24
3. Materiais e Métodos	27
3.1 Caracterização das infusões das plantas medicinais.....	27
3.1.1 Infusão de barbas de milho.....	27
3.1.2 Infusão de carqueja.....	27
3.1.3 Infusão de dente de leão	28
3.1.4 Infusão de folhas de oliveira	28
3.1.5 Infusão de urtiga-branca.....	28
3.2 Reagentes e meio de cultura.....	29
3.3 Preparação das infusões das plantas medicinais.....	29
3.4 Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteau	30
3.5 Quantificação dos Flavonóides Totais	31
3.6 Determinação da actividade antioxidante das diferentes infusões medicinais	32
3.6.1 Determinação da actividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP	32
3.6.2 Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC	33
3.6.3 Determinação da capacidade de quelação de Fe (II)	33

3.6.4 Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detectada pela diminuição da formação de formazano	34
3.6.5 Determinação da capacidade de sequestro do radical hidroxilo através do ensaio de degradação da desoxirribose	35
3.6.6 Determinação da capacidade de sequestro do radical peroxilo detectada pelo ensaio ORAC	37
3.7 Avaliação da actividade mutagénica e antimutagénica através do teste de Ames	38
3.7.1 Caracterização da estirpe utilizada	40
3.7.2 Realização do teste de Ames	40
3.8 Análise estatística dos dados	42
4. Resultados e Discussão	43
4.1 Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteu	43
4.2 Quantificação dos Flavonóides Totais	44
4.3 Determinação da actividade antioxidante das diferentes infusões medicinais	46
4.3.1 Determinação da actividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP	46
4.3.2 Determinação da redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC	47
4.3.3 Determinação da capacidade de quelação de Fe (II)	49
4.3.4 Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detectada pela diminuição da formação de formazano	51
4.3.5 Determinação da capacidade de sequestro do radical hidroxilo através do ensaio de degradação da desoxirribose	53
4.3.6 Determinação da capacidade de sequestro do radical peroxilo detectada pelo ensaio ORAC	54
4.4 Avaliação da actividade mutagénica e antimutagénica através do teste de Ames	55
4.5 Análise global dos resultados	57
5. Conclusão	62
6. Referências Bibliográficas	65

Índice de Figuras

Figura 1.1- A-- Planta da carqueja; B- Pormenor da flor de carqueja	5
Figura 1.2- A- Planta de dente de leão; B - Pormenor da flor de dente de leão	6
Figura 1.3 A-Campo de milho; B-Pormenor da planta do milho, onde são visíveis os estigma e estilete (barbas) e afolha	8
Figura 1.4 A-Árvore da Oliveira; B- Pormenor da folha de oliveira	9
Figura 1.5 A- Planta de urtiga-branca; B- Pormenor das folhas e flores da urtiga-branca	10
Figura 2.1 Principais causas e consequências da acção dos radicais livres	12
Figura 2.2 Principais classes de compostos fenólicos	23
Figura 3.1 Aspecto das barbas de milho e da respectivo infusão.....	27
Figura 3.2 Aspecto da carqueja e da respectiva infusão	27
Figura 3.3 Aspecto do dente de leão e da respectiva infusão.....	28
Figura 3.4 Aspecto das folhas de oliveira e da respectiva infusão.....	28
Figura 3.5 Aspecto da urtiga branca e das respectivas infusões	28
Figura 3.6 Formação do complexo(Fe ²⁺ -TPTZ) após redução do Fe ³⁺ por um antioxidante...32	
Figura 3.7 Estrutura do (A) NBT ²⁺ e do (B) formazano.....	35
Figura 3.8 Reacção de oxidação do AAPH	37
Figura 3.9 Esquema das reacções elementares ocorridas no ensaio ORAC. O AAPH produz os radicais peróxido que oxidam a fluoresceína. Na presença de um antioxidante (AH), este desactiva o radical peróxido, dando origem a compostos não reactivos (ROOH e ROOA), (R1=COOH e R2=OCOOH)	37
Figura 4.1 Recta de calibração com ácido gálico	43
Figura 4.2 Recta de calibração de quercetina utilizada na determinação dos flavonóides totais	45
Figura 4.3 Recta de calibração de sulfato ferroso para o ensaio FRAP.	46
Figura 4.4 Recta de calibração de ácido ascórbico para a realização do ensaio CUPRAC	48
Figura 4.5 Curvas de dose-resposta para a inibição da formação de complexos [Fe(Ferrozina) ₃] ⁴ (capacidade de quelação de Fe (II)) das infusões de (A) barbas de milho, (B) carqueja, (C) dente de leão,	50
Figura 4.6 Efeito das infusões de (A) barbas de milho, (B) carqueja, (C) dente de leão, (D) folhas de oliveira e (E) urtiga-branca sobre a redução do NBT induzida pelo radical anião superóxido gerado no sistema NADH/PMS	53
Figura 4.7 Curvas de dose-resposta das infusões de (A) barbas de milho, (B) carqueja, (C) dente de leão, (D) folhas de oliveira (E) urtiga branca na presença e na ausência de t-BHP, na estirpe TA102	56
Figura 4.8 Percentagem máxima de inibição da mutagenicidade do t-BHP exercida pelas amostras das infusões barbas de milho, carqueja, dente de leão, folhas de oliveira e urtiga-branca.....	57

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 Composição do reagente FRAP	32
Tabela 3.2 Composição da gelose de superfícies por Ames, litro.....	41
Tabela 3.3- Composição do meio VB (por litro).....	41
Tabela 4.1 Compostos fenólicos totais obtidos através de dois métodos	43
Tabela 4.2 Teor em flavonóides totais nas amostras testadas	45
Tabela 4.3 Valores obtidos com as diferentes infusões no ensaio FRAP	47
Tabela 4.4 Valores obtidos com as diferentes amostras no ensaio CUPRAC	48
Tabela 4.5 Valores de IC ₅₀ (% de amostra) das diferentes amostras no ensaio de quelação do Fe(II).....	51
Tabela 4.6 Valores de IC ₅₀ (% de amostra) das diferentes amostras de infusões de ervas para a actividade de sequestro do radical anião superóxido	52
Tabela 4.7 Percentagem de inibição da degradação da desoxirribose em presença das diferentes amostras.	54
Tabela 4.8 Valores obtidos com as diferentes infusões de ervas no ensaio ORAC.	55
Tabela 4.9 Classificação da correlação em função do valor do coeficiente de correlação de Pearson.....	58
Tabela 4.10 Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição em fenóis totais e em flavonóides das cinco amostras estudadas	58
Tabela 4.11 Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e actividade antioxidante das várias amostras sem o ensaio de quelação do ferro.....	59
Tabela 4.12 Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e actividade antioxidante das amostras barbas de milho, carqueja, dente de leão e urtiga-branca.....	61

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AAPH - 2,2'-Azobis(2-metilpropionamida) dihidroclorato

A- Adenina

ATP- Trifosfato de adenosina

λ - Comprimento de onda

C- Citosina

CUPRAC- Cupric Reducing antioxidant capacity

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Sal dissódico de ácido etilenodiaminatetracético

eq - Equivalente

FRAP - Ferric Reduction Antioxidant Power

G – Guanina

GPX - Glutathione peroxidase

GSH- Glutathione reduzida

GSSH - Glutathione oxidada

GSR- Glutathione reductase

GST – Glutathione-S-transferase

HAT - Hydrogen atom transfer (transferência de um átomo de hidrogénio)

LDL- Lipoproteínas de baixa densidade

MDA- Malondialdeído

NB - Meio de cultura Nutrient Broth

NBT – Azul de nitrotetrazólio

NADH- Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida

NADPH- Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

nm - Nanómetro

ORAC - Oxygen Radical Absorbance Capacity

PMS – Metossulfato de fenazina

ROS - Espécies reactivas de oxigénio

rpm - Rotações por minuto

SET - Single electron transfer (transferência de um electrão)

SOD - Superóxido dismutase

T- Timina

TBA- Ácido tiobarbitúrico

t-BHP - *tert*-Butil-hidroperóxido

TPTZ - Tripiridítriazina

VB - Meio de cultura Vogel-Bonner

Introdução

Desde os tempos primordiais, o Homem vem procurando na natureza, recursos que melhorem as suas condições de vida para, assim, aumentar as suas possibilidades de sobrevivência através da melhoria da sua saúde.

Estudos epidemiológicos sobre a relação entre hábitos alimentares e risco de doenças demonstraram que a alimentação possui um impacto directo sobre a saúde, podendo esse impacto ser positivo, quando alimentação parece promover a saúde, conferindo protecção contra determinadas patologias, ou ser negativo, quando a alimentação contribui para o aparecimento de determinadas doenças. É na generalidade aceite que alimentos de origem vegetal ou derivados de vegetais como chás, frutos, grãos, legumes, especiarias, etc., exercem efeitos benéficos na saúde, particularmente em doenças relacionadas com o envelhecimento. À medida que a esperança média de vida aumenta, as doenças crónicas relacionadas com a idade como, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, vários tipos de cancro, diabetes tipo 2, conhecidos pela sua relação com os hábitos alimentares, tendem, igualmente, a aumentar (Espín *et al.*, 2007).

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) parecem estar implicadas na etiologia de diversas destas doenças degenerativas assim como no processo de envelhecimento (Toyokuni, 1999). Para lidar com as ROS os organismos possuem vários tipos de defesa antioxidante, ou seja, de moléculas capazes de estabilizar ou desactivar as ROS antes destas conseguirem atacar os seus alvos biológicos. Contudo, quando presentes em quantidades limitantes, estes antioxidantes, não conseguem dar vazão à quantidade de ROS geradas o que, consequentemente, conduz ao “stress” oxidativo e à acumulação de lesões (Atoui *et al.*, 2005). O papel protector que os antioxidantes podem exercer sobre a saúde tem vindo a despertar um interesse crescente no estudo destes compostos, e, em particular, daqueles que nos podem ser veiculados pela alimentação.

Os últimos anos têm sido ricos em informações provenientes de laboratórios de todo o mundo sobre o impacto positivo da alimentação na saúde humana e, cada vez mais, se vai dando ênfase aos fenómenos que ocorrem a nível celular. Componentes potencialmente activos de frutas, ervas, raízes e folhas utilizados directamente na alimentação, na preparação de chás ou como condimentos (especiarias e ervas aromáticas) têm sido extensivamente estudados. Os resultados sugerem que os polifenóis, especialmente os flavonóides presentes nesses vegetais tenham um elevado poder antioxidante, sendo capazes de proteger as células contra os efeitos adversos das ROS (Dufresne & Farnworth, 2001), apresentando ainda outras propriedades que se traduzem em benefícios para o organismo, tais como actividade anti-inflamatória ou anti-microbiana (Almajano *et al.*, 2008; Atoui *et al.*, 2005).

A actividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se, essencialmente, às suas propriedades redutoras, que lhes permitem agir como agentes redutores, à sua possibilidade de funcionar como doadores de átomos de hidrogénio ou ainda como agentes quelantes de metais (Atoui *et al.*, 2005; Soobrattee *et al.*, 2005).

O consumo de chá é conhecido como um hábito muito antigo. Lendas da China e da Índia indicam que este se iniciou há mais de cinco mil anos. No entanto, pesquisas arqueológicas, sugerem que a infusão de folhas de diferentes plantas selvagens era, provavelmente, já praticada há mais de 500 000 anos. Tradicionalmente, o chá era bebido para melhorar o fluxo sanguíneo, eliminar toxinas e melhorar a resistência a doenças, sendo este hábito introduzido progressivamente em todo o mundo, através comerciantes e viajantes (Dufresne & Farnworth, 2001). Actualmente o consumo de infusões tornou-se muito popular, tendo vários grupos de investigação vindo a debruçar o seu trabalho sobre o estudo das suas propriedades, especialmente daquelas que estão relacionadas com a promoção da saúde, e que incluem, entre outras, as propriedades antioxidante e antimicrobiana.

Uma vez que as infusões de ervas medicinais se apresentam como uma das principais fontes de polifenóis na dieta, o objectivo deste trabalho foi estimar o conteúdo em compostos fenólicos totais e, em particular em flavonóides, de diferentes infusões, nomeadamente infusão de carqueja, dente de leão, barbas de milho, folhas de oliveira e urtiga-branca. Foi também objectivo deste trabalho avaliar a capacidade antioxidante destas infusões através de diferentes ensaios, nomeadamente, ensaios de avaliação da sua capacidade redutora, da sua capacidade para sequestrar várias espécies reactivas de oxigénio e a ainda da sua capacidade de quelação de ferro. Foi ainda avaliado o potencial antimutagénico destas infusões, através do estudo da sua capacidade para inibir a mutagenicidade do mutagénico oxidativo *tert*-butil-hidroperóxido (t-BHP). Tentou-se ainda estabelecer correlação entre o conteúdo em compostos fenólicos e a actividade antioxidante das diferentes infusões.

A presente dissertação inicia-se com dois capítulos teóricos de revisão bibliográfica. No primeiro desses capítulos é efectuada uma breve caracterização das plantas medicinais, alimentos funcionais e nutracêuticos no geral e procede-se à caracterização das plantas medicinais em estudo, nomeadamente, no que concerne à sua composição química e propriedades funcionais. No segundo capítulo é feita uma revisão bibliográfica sobre o “stress” oxidativo, as espécies reactivas de oxigénio, os antioxidantes e ainda sobre a actividade mutagénica e a relação desta com as ROS e com os antioxidantes, tanto endógenos como alimentares. A caracterização das amostras estudadas e os procedimentos experimentais seguidos são descritos no capítulo três. Os resultados e discussão são apresentados no capítulo quatro e, por fim, no capítulo cinco são apresentadas as principais conclusões retiradas do trabalho efectuado, assim como as perspectivas futuras.

1. Plantas Medicinais, Alimentos Funcionais e Nutracêuticos

A utilização de plantas para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. O Homem utiliza, portanto, as plantas desde sempre, quer como alimentos, quer para fins curativos e todas as civilizações foram progressivamente descobrindo as suas virtudes e segredos. Assim, ao longo dos tempos, o Homem tem vindo sempre a desenvolver o seu conhecimento sobre as plantas e sobre as suas propriedades terapêuticas.

O uso de plantas ou de medicamentos à base de plantas para tratar ou prevenir doenças designa-se por fitoterapia. Actualmente existem provas da sua eficácia, assim como dos seus benefícios incontestáveis para a saúde, que a tornam numa aliada segura e eficaz no tratamento de vários problemas de saúde (Proença-da-Cunha *et al.*, 2003). Apesar da grande evolução que tem sofrido a medicina convencional, existem ainda obstáculos básicos à sua utilização pelas populações mais carentes, que vão desde a impossibilidade de acesso aos centros de atendimento hospitalar à impossibilidade de realização de exames ou de obtenção de medicamentos. Estes motivos, associados à fácil obtenção e à grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em vias de desenvolvimento.

A nível científico tem vindo a assistir-se a um crescente interesse pelo estudo das plantas medicinais, ocorrendo assim, um aumento da investigação nesta área da saúde, por parte de instituições universitárias e de organismos profissionais, com o consequente aparecimento de publicações especializadas de nível internacional com grande qualidade e rigor científico, que incluem não só revistas como também outras formas de divulgação (livros, base de dados, etc.). Assim, hoje a fitoterapia deixou de se fundamentar no uso tradicional, passando ao contrário do que se verificava anteriormente, a estar cada vez mais apoiada em aspectos científicos e de qualidade, eficácia e segurança (Proença-da-Cunha *et al.*, 2003).

Nos últimos anos tem, igualmente, sido possível testemunhar um crescente interesse na capacidade que alguns alimentos, tanto de origem vegetal como animal, demonstram para reduzir o risco de desenvolvimento de doenças crónicas. No caso dos alimentos de origem vegetal, essa capacidade, tem sido associada, pelo menos em parte, à ocorrência de metabolitos secundários, considerados não-nutrientes (fitoquímicos), e que têm demonstrado exercer várias actividades biológicas benéficas.

A correlação entre a baixa incidência de doenças em alguns povos e a sua alimentação tem, portanto, chamado a atenção de vários investigadores. Os esquimós, com sua alimentação rica em peixes e produtos do mar ricos em ácidos gordos poli-insaturados das famílias ómega 3 e ómega 6, possuem baixo índice de problemas cardiovasculares. Os orientais, pensa-se que

devido ao consumo de soja, que contém fitoestrogénios, apresentam baixa incidência de cancro de mama. Nestes países, o costume de consumir frutas e verduras também resulta numa redução do risco de doenças cardiovasculares e de cancro, comprovada por dados epidemiológicos (Moraes & Colla, 2006).

Os metabolitos presentes nesses alimentos vegetais, apesar de, quando comparados com determinados produtos farmacêuticos, poderem apresentar uma baixa potência como compostos bioactivos, podem, desde que ingeridos regularmente e em quantidades significativas como parte da dieta, ter efeitos fisiológicos perceptíveis a longo prazo. Surge, assim, o conceito de alimentos funcionais, isto é, de alimentos que para além da sua função nutricional ou energética exercem, quando consumidos regularmente, um efeito fisiológico benéfico, sendo que esse efeito deve ser cientificamente comprovado (Espín *et al.*, 2007).

Exemplos de fitoquímicos presentes na alimentação e que têm sido descritos como sendo benéficos para a saúde humana, incluem, entre outros, isotiocianatos existentes nas crucíferas, compostos sulfurados do alho e da cebola, carotenóides, como o licopeno ou o β -caroteno, terpenos, flavonóides e ácidos fenólicos. Estes compostos podem promover a saúde através de múltiplos mecanismos, como, por exemplo, por conseguirem inactivar radicais livres (propriedades antioxidantes), desactivarem cancerígenos, alterarem a expressão genética, inibindo a expressão de genes alterados envolvidos na cancerigénese ou aumentando a expressão de genes envolvidos nos processos de destoxificação de xenobióticos ou de reparação do DNA, exercerem efeitos favoráveis nos lípidos e lipoproteínas de baixa densidade do plasma ou inibirem a proliferação de células neoplásicas (revisto em Kris-Etherton *et al.*, 2002).

A procura por parte dos consumidores de produtos alimentares, capazes de promover a saúde, bem como de produtos não alimentares (isto é, dietéticos e farmacêuticos) contendo os princípios activos presentes nestes alimentos tem vindo a aumentar. Desta forma, muitos dos constituintes bioactivos presentes nos alimentos têm vindo a ser comercializados sob a forma de produtos farmacêuticos (comprimidos, cápsulas, soluções, géis, licores, pós, granulados, etc.) que incorporam extractos de alimentos ou extractos de fitoquímicos aos quais as funções fisiológicas benéficas foram directa ou indirectamente atribuídas. Para designar esta nova gama de produtos, que não pode ser verdadeiramente classificada como “alimento”, surgiu um novo termo híbrido entre nutriente e medicamento, o termo "Nutracêutico". Os nutracêuticos são assim suplementos dietéticos que fornecem na forma de concentrados, agentes bioactivos de alimentos, numa matriz não-alimentar, e são utilizados com a finalidade de melhorar a saúde em doses que excedem aquelas que poderiam ser obtidas a partir de uma alimentação normal, sendo vendidos em apresentações semelhantes à dos fármacos (comprimidos, extractos, pílulas, etc.) (Espín *et al.*, 2007).

1.1 Caracterização das plantas medicinais estudadas

1.1.1 Carqueja

A planta *Pterospartum tridentatum* (L.) (Figura 1.1) é uma leguminosa perene endémica da Europa, pertencente à subfamília *Papilionoideae* vulgarmente conhecida em Portugal por Carqueja. É uma espécie com ampla distribuição na zona ocidental da Península Ibérica, incluindo todo o território continental de Portugal (Vítor *et al.*, 2004).

Os seus ápices florais, normalmente secos, são muito usados na medicina popular, para o tratamento de várias afecções incluindo, constipações, problemas de rins, problemas de fígado e reumatismo, sendo também indicado para a pneumonia e diabetes (Coelho *et al.*, 2011). A infusão das porções terminais secas em floração é usada como uma excelente bebida e emoliente mas também para problemas no fígado, bexiga, rins e reumatismo. Para além de ser consumida sob a forma de chá, a carqueja é, igualmente, utilizada como condimento tradicionalmente adicionado ao arroz (arroz de carqueja) e à carne assada (Grosso *et al.*, 2007).



Figura 1.1 - A- Planta da carqueja; B- Pormenor da flor de carqueja (A-<http://rouxinoldepomares.blogs.sapo.pt/193522.html>; B-<http://plantas-e-pessoas.blogspot.com/2009/04/as-subespecies-de-pterospartum.html>).

Segundo Vítor e colaboradores (2004), as flores de carqueja são um dos ingredientes de várias misturas de ervas vendidas em Portugal para o tratamento da diabetes. Uma vez que a carqueja é rica em compostos fenólicos e que o aumento de radicais livres parece ser responsável por algumas das complicações da diabetes, nomeadamente as que afectam o tecido vascular, o tratamento com antioxidantes é um dos tratamentos recomendados. Análises efectuadas aos extractos aquosos da *P. tridentatum* revelaram a presença de alcalóides, compostos fenólicos (incluindo flavonóides) e terpenóides glicosilados. Os compostos fenólicos e os alcalóides, metabolitos secundários característicos das leguminosas, podem ser os responsáveis pelas propriedades farmacológicas atribuídos à carqueja (Vítor *et al.*, 2004).

1.1.2 Dente de Leão

A *Taraxacum officinale* (Figura 1.2), vulgarmente conhecida como dente de leão é uma planta perene pertencente à família *Asteraceae*, subfamília *Lactuceae* e encontra-se amplamente distribuída pelas zonas quentes e temperadas do Hemisfério Norte, habitando campos, estradas e zonas rurais (Schutz *et al.*, 2006). O género *Taraxacum* inclui aproximadamente 30 a 57 variedades, com várias microespécies, divididas em nove secções. Na Europa, as plantas da espécie *Taraxacum officinale* pertencentes à secção Borealia são usados para fins medicinais, sendo as plantas das espécies *Taraxacum platycarpum* mais utilizadas na medicina tradicional chinesa (Schutz *et al.*, 2006).



Figura 1.2- A- Planta de dente de leão; B - Pormenor da flor de dente de leão
(<http://pt.wikipedia.org/wiki/Dente-de-leão>)

O dente de leão tem sido utilizado na medicina tradicional, como um fitomedicamento, como laxante, diurético, agente anti-reumático, hipoglicémico, sendo também capaz de aumentar a produção e a excreção das secreções biliares facilitando assim a digestão dos alimentos com elevado teor em lípidos. As infusões preparadas a partir das raízes ou da parte aérea da planta são ainda utilizadas no tratamento da falta de apetite, das inflamações urinárias e de cálculos renais, sendo as infusões e xaropes preparados a partir das flores principalmente utilizados no tratamento de infecções do tracto respiratório superior (Hu & Kitts, 2005, Bylka *et al.*, 2010).

As aplicações empíricas do dente de leão na medicina tradicional têm vindo a ser comprovadas por diversos trabalhos, que demonstraram, através da realização de ensaios *in vitro* ou *in vivo* em animais de laboratório, a existência de actividade antioxidante, anti-inflamatória, diurética, colerética, anti-cancerígena, analgésica, anti-alérgica, anti-hiperglicémica e anti-trombótica (revisto em Schutz *et al.*, 2006). Mais ainda, o elevado teor em oligofrutas presente nas infusões preparadas a partir da raiz, parece estimular o crescimento *in*

vitro de diversas estirpes de bifidobacteria, constituintes da flora intestinal e que têm provado contribuir para a promoção da saúde, pelo que esta actividade pode ser encarada como um possível efeito prebiótico (Trojanová *et al.*, 2004).

As raízes contêm compostos como os gemacranólidos e o taraxacósido (derivado do ácido p-hidroxifenilacético), designados de compostos amargos, vários polifenóis como os fitosteróis e flavonóides derivados da apigenina e da luteolina, triterpenos, inulina, sais minerais e mucilagem. As folhas contêm flavonóides, alguns constituintes amargos e sais minerais (Proença-da-Cunha *et al.*, 2003). As propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes destas infusões têm sido atribuídas essencialmente à presença de vários polifenóis e sesquiterpenos (Hu & Kitts, 2005; Schütz *et al.*, 2006).

1.1.3 Milho

A planta do milho, *Zea mays* (L), (Figura 1.3) pertence à família das *Poaceae* e à subfamília das *Panicoideae*. É uma planta anual, nativa dos Andes e da América Central e cultivada em quase todos os continentes (Proença-da-Cunha *et al.*, 2003). Este cereal, juntamente com o trigo e com o arroz, constitui uma das principais culturas do mundo, sendo utilizado na alimentação humana e animal, estimando-se que seja responsável pelo fornecimento de cerca de 15% da proteína e 20% das calorias da alimentação humana (Nuss & Tanumihardjo, 2010). Para além do seu interesse nutricional, mais recentemente, o milho tem sido, igualmente, cultivado para servir de matéria-prima para a produção de bioetanol, sendo que o milho produzido para este fim representa já em 2003 mais de 10% do total de milho produzido nos Estados Unidos da América (Bothast & Schlicher, 2005).



Figura 1.3- A-Campo de milho; B-Pormenor da planta do milho, onde são visíveis os estigma e estilete (barbas) e afolha (A-<http://maisagronegocio.com/198/dicas-de-como-cultivar-milho/>; B-<http://pt.wikipedia.org/wiki/Milho>).

Os estiletes e estigmas, vulgarmente chamados de barbas de milho, e as folhas são bastante usados na conservação tradicional de alimentos (Proença-da-Cunha *et al.*, 2003). As barbas de milho são muito utilizadas na preparação de infusões aplicadas na medicina tradicional devido às suas propriedades diuréticas, bem como no tratamento de afecções genitourinárias, gota, edemas, obesidade acompanhada de retenção de líquidos, nefrites ou prostatites (Maksimović *et al.*, 2005; Velazquez *et al.*, 2005).

Os estiletes e estigmas do milho (barbas de milho) contêm na sua constituição proteínas, vitaminas, açúcares, sais de cálcio, potássio, magnésio e sódio, esteróides, alcalóides, polifenóis como taninos, flavonóides, proantocianidinas, antocianinas, ácidos hidroxicinâmicos, bem como, vestígios de óleos essenciais (Maksimović *et al.*, 2005; Velazquez *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011).

Diversos trabalhos científicos já permitiram confirmar a actividade diurética dos extractos de barbas de milho bem como comprovar a existência de várias actividades biológicas capazes de promover a saúde tais como propriedades antioxidantes, antimicrobiana, antiproliferativa, estimuladora da função imunitária e antidiabética (Maksimović *et al.*, 2005; Velazquez *et al.*, 2005; revisto em Liu *et al.*, 2011).

1.1.4 Oliveira

A árvore da oliveira (Figura 1.4), *Olea europaea L.*, pertencente a família *Oleaceae* é uma das mais importantes árvores de frutos dos países mediterrâneos, onde cobre cerca de 8 milhões de hectares, representando quase 98% da colheita mundial (Ferreira *et al.*, 2007; Guinda *et al.*, 2004; Tabera *et al.*, 2004; Proença-da-Cunha *et al.*, 2003). As folhas de oliveira são um dos subprodutos da agricultura do olival. Podem ser encontradas em quantidades elevadas nas indústrias de produção do azeite (chegando a representar cerca de 10% do peso total das azeitonas) e ainda como produto da poda das árvores de oliveira (Ferreira *et al.*, 2007; Tabera *et al.*, 2004).

As folhas de oliveira são utilizadas na medicina tradicional e na fitoterapia para tratar e prevenir a hipertensão, bem como, pelas suas propriedades anti-sépticas, hipoglicémicas e diuréticas sendo, igualmente, utilizadas para combater dores de cabeça, febres e outras doenças como, por exemplo, a malária (Benavente-Garcia *et al.*, 2000; Somova *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2007).



Figura 1.4- A-Árvore da Oliveira; B- Pormenor da folha de oliveira

(A)<http://www.midiagospel.com.br/images/stories/geral/biblicos/arvores/arvore-oliveira.jpg>; B)
<http://www.medplan.com.br/materias/4/7511.html>).

Os efeitos hipotensores e hipoglicémicos das folhas de oliveira têm sido bem documentados quer, pela realização de ensaios experimentais em animais de laboratório, quer pela realização de ensaios clínicos (Somova *et al.*, 2003). Com efeito, o extracto de folhas de oliveira tem a capacidade de baixar a pressão arterial em animais e aumentar o fluxo sanguíneo nas artérias coronárias, além de aliviar arritmias e prevenir espasmos musculares intestinais (Benavente-Garcia *et al.*, 2000). Mais ainda, estes extractos têm demonstrado, em ensaios em animais de laboratório, possuir uma série de actividades biológicas que incluem actividade antioxidante, antimicrobiana, antiviral ou antiinflamatória (revisto em Hayes *et al.*, 2011).

Diversos compostos isolados em extractos preparados a partir de folhas de oliveira parecem poder contribuir para estes efeitos. Entre esses compostos encontram-se, entre outros, o ácido oleanólico, que chega a representar cerca de 3% do peso seco das folhas de algumas variedades de oliveira (Guinda *et al.*, 2004) e que parece contribuir para os efeitos hipotensores e anti ateroscleróticos (Somova *et al.*, 2003), o α -tocoferol, β -caroteno, β -sitosterol e esqualeno (Tabera *et al.*, 2004), catequina, ácido cafeico, ácido vanílico, rutina (Benavente-Garcia *et al.*, 2000) oleuropeína, luteolina-7-O-glucosido, apigenina-7-O-glucosido, hidroxitirosol e tirosol (Hayes *et al.*, 2011).

As diversas actividades benéficas que o ácido oleanólico tem vindo a demonstrar (revisto em Liu *et al.*, 1995), têm despertado o interesse para o estudo da sua extracção a partir dos resíduos de produção do azeite, com vista à sua posterior incorporação em óleos alimentares vegetais, por forma a, por um lado, melhorar a resistência destes à oxidação lipídica e, por outro lado, a conferir a estes óleos e aos alimentos que os incorporarão propriedades funcionais (Guinda *et al.*, 2004).

1.1.5 Urtiga-branca

A urtiga-branca (Figura 1.5), *Lamium album*, é uma planta vivaz pertencente a família *Lamiaceae*. Nativa da Europa e da Ásia Central e Setentrional, esta planta, cresce numa variedade de habitats, geralmente em solos férteis e húmidos. À semelhança de muitos outros membros da família *Lamiaceae*, a urtiga-branca parece superficialmente similar à planta urtica dioica, no entanto, ao contrário desta, não possui os chamados pêlos vesicantes, daí o também nome comum "urtiga-morta". As folhas jovens são comestíveis, podendo ser usadas em saladas ou cozidas como um vegetal (Proença-da-Cunha *et al.*, 2003).

Tradicionalmente a urtiga-branca é usada pelas suas propriedades diuréticas, laxantes, antiespasmódicas e hemostáticas. Além disso, é também utilizada no combate a problemas renais, de bexiga, e problemas menstruais (menorragia, hemorragia uterina, etc.), no alívio da dor causada por problemas reumáticos, no tratamento da bronquite crónica e de feridas e inflamações cutâneas (Proença-da-Cunha *et al.*, 2003; Trouillas *et al.*, 2003; Matkowski & Piotrowska, 2006; Paduch *et al.*, 2007; Akkol *et al.*, 2008; Krishnaiah *et al.*, 2011).



Figura 1.5- A- Planta de urtiga-branca; B- Pormenor das folhas e flores da urtiga-branca
(A)<http://luirig.altervista.org/schedenam/fnam.php?taxon=Lamium+album>,
B)- <http://luirig.altervista.org/schedenam/fnam.php?taxon=Lamium+album>).

A análise de diversos extractos, preparados a partir desta planta, tem permitido identificar flavonóides, ácidos fenólicos, glicosídeos iridóides, ácidos gordos, polissacáridos, saponinas e taninos na sua composição (Trouillas *et al.*, 2003; Matkowski & Piotrowska, 2006).

Ensaio laboratoriais têm mostrado, que os extractos aquosos ou alcoólicos preparados a partir desta planta, apresentam actividade antiproliferativa em linhas celulares de melanoma de ratinho (Trouillas *et al.*, 2003), enquanto que extractos preparados com solventes menos polares, contendo elevada concentração de triterpenos, estimulam o crescimento de fibroblastos

humanos indicando, neste último caso, potencial para serem aplicados como agentes de cicatrização (Paduch *et al.*, 2007). Estes extractos têm ainda demonstrado actividade antioxidante e antiinflamatória (Matkowski & Piotrowska, 2006; Krishnaiah *et al.*, 2011), propriedades que podem estar relacionadas com as aplicações que esta planta tem na medicina tradicional.

2. Antioxidantes e “Stress” Oxidativo

O oxigénio possui um papel central na complexa evolução da vida na terra, principalmente devido à simetria bioquímica entre a fotossíntese e a respiração aeróbia que mantém a homeostase na biosfera do planeta (Buonocore *et al.*, 2010). Todos os organismos aeróbios utilizam o oxigénio molecular para gerar trifosfato de adenosina (ATP), ou seja, para gerar a energia necessária para a manutenção da vida (Sorg, 2004; Buonocore *et al.*, 2010).

No entanto, o oxigénio pode tornar-se tóxico e mutagénico devido ao seu forte poder oxidante e à impossibilidade de evitar a ocorrência de reacções secundárias que dão origem a espécies reactivas de oxigénio (ROS). Diversas evidências científicas têm comprovado que as ROS podem desempenhar papéis fisiológicos importantes ao funcionarem como mensageiros secundários nas células de mamíferos, regulando vias de transdução de sinal, que controlam a expressão de genes e a indução de alterações pós-traducionais de proteínas, estando, assim, implicadas no controlo dos processos de divisão e diferenciação celular (Al-Gubory *et al.*, 2010). Contudo, quando em excesso, estas espécies são responsáveis por oxidações que acabam por ter consequências deletérias para o organismo se não forem atempadamente neutralizadas por um sistema eficiente de antioxidantes (Dufresne & Farnworth, 2001; Sorg, 2004; Buonocore *et al.*, 2010).

As ROS estão continuamente a ser formadas nas células como resultado do metabolismo, através da acção de compostos exógenos ou da radiação. Quando produzidas nas células, as ROS são capazes de reagir com quase todo o tipo de biomoléculas. Estima-se que todos os dias mais de dez mil reacções de oxidação causem danos no DNA de cada célula humana, podendo estas lesões oxidativas ser considerados as lesões mais comuns no DNA (Møller & Wallin, 1998). A partir destas evidências foi introduzido o conceito de “stress” oxidativo para descrever situações que acontecem em organismos aeróbios quando as reacções secundárias indesejáveis, induzidas pelo oxigénio e seus derivados, não são eficientemente neutralizados, conduzindo, consequentemente, a perdas de função fisiológica, doenças e, potencialmente, à morte (Figura 2.1). O “stress” oxidativo acaba assim por ser essencialmente um desequilíbrio entre a produção de espécies oxidativas e a sua respectiva neutralização por parte dos antioxidantes (Sorg, 2004; Ratnam *et al.*, 2006). Este desequilíbrio pode resultar de uma depleção de antioxidantes, devida, por exemplo, a uma nutrição deficiente ou de uma produção em excesso de espécies reactivas de oxigénio, tanto de origem endógena como exógena.

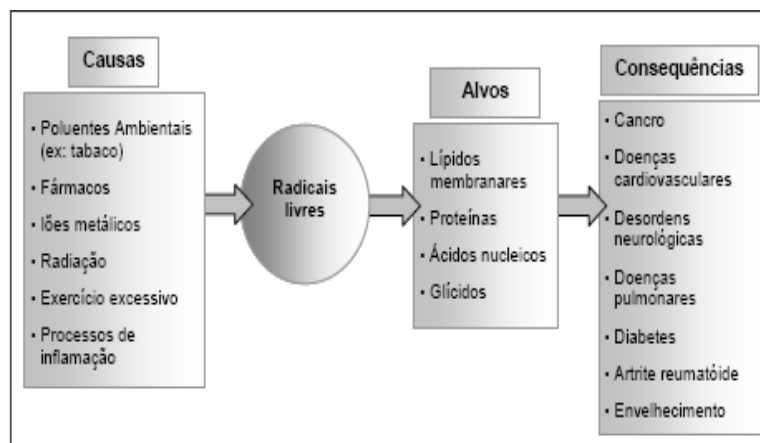


Figura 2.1- Principais causas e consequências da acção dos radicais livres (Ferreira e Abreu, 2007).

2.1 Espécies reactivas de oxigénio

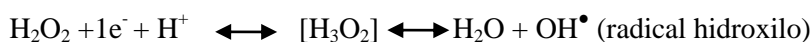
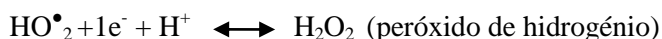
Espécies reactivas de oxigénio (ROS) é uma designação colectiva que inclui espécies radicalares como o radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) ou o radical hidroxilo (OH^{\bullet}) e não radicalares como, por exemplo o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou o oxigénio singlete (1O_2). Assim, todas as espécies tóxicas de oxigénio são ROS mas nem todas as ROS são radicais de oxigénio (Haliwell & Chirico, 1993; Sorg, 2004; Buoncore *et al.*, 2010).

Os radicais são assim designados porque contêm pelo menos um electrão desemparelhado e possuem uma existência independente. A ocorrência de um electrão desemparelhado resulta numa elevada reactividade destas espécies, devido à sua capacidade para doar ou receber electrões de forma a obter estabilidade química. Desta forma, a maioria dos radicais tem um tempo de semi-vida curto, reagindo rapidamente com outras moléculas. Por exemplo, o OH^{\bullet} pode “sobreviver” apenas 10^{-10} segundos em sistemas biológicos, sendo as suas constantes de velocidade de reacção extremamente elevadas e, em vários casos, controladas por difusão (Kohen & Nyska, 2002). As espécies não radicalares podem possuir tempos de semi-vida mais prolongados, podendo variar de partes de segundos até horas, dependendo da espécie em causa e também de outros factores, como o pH ou a presença de outros compostos. De uma forma geral, espécies com maior tempo de semi-vida podem difundir-se e ir interagir e causar danos em alvos biológicos mais afastados do seu local de produção. Por exemplo, o radical anião superóxido, apesar de ser uma espécie radicalar, possui um tempo de semi-vida suficientemente longo que lhe permite mover-se e interagir com alvos biológicos mais distantes do seu local de produção. Pelo contrário, os possíveis danos causados pelo radical hidroxilo estão mais confinados aos alvos biológicos que se encontram imediatamente adjacentes ao seu local de produção (Kohen & Nyska, 2002).

O oxigénio funciona com aceitador de electrões no processo transporte electrónico que ocorre na mitocôndria e que é essencial para a produção de ATP nas células de mamíferos. Neste processo, o oxigénio é reduzido a água através da aquisição de quatro electrões (Valko *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2010):



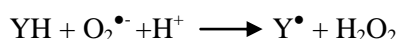
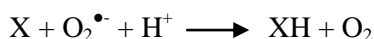
A formação de radicais pode, então, acontecer através dos seguintes passos:



Desta forma, através da redução do oxigénio são geradas espécies reactivas de oxigénio como: o radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radical hidroxilo (OH^\bullet), sendo a segunda a mais estável e, por isso, capaz de sofrer maior acumulação (Buonocore *et al.*, 2010).

2.1.1. Anião superóxido

O anião superóxido é considerado uma ROS primária, uma vez que ao reagir com outras moléculas pode gerar outras ROS, denominadas de ROS “secundárias”, podendo ser um factor tanto oxidante como redutor, isto é, através da reacção de redução é produzido oxigénio molecular enquanto que pela reacção de oxidação ocorre a formação do peróxido de oxigénio (Buonocore *et al.*, 2010).



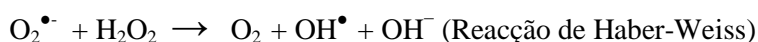
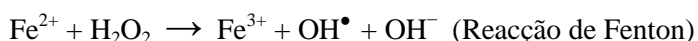
Nas células dos mamíferos a cadeia respiratória mitocondrial e a oxidação do hemo, que ocorre durante a ligação do oxigénio ao Fe(II) do hemo da desoxihemoglobina, constituem as duas principais vias de formação deste radical (Buonocore *et al.*, 2010).

O radical anião superóxido pode, igualmente, formar-se no decurso da actividade de outras enzimas, como, por exemplo, a xantina oxidase, as aldeído oxidase, os citocromos P450, ou a fosfato de dinucleotideo de adenina e nicotinamida (NADPH)-oxidase em neutrófilos e macrófagos activados durante o processo inflamatório (Parkinson, 1996; Sorg, 2004; Buonocore

et al., 2010), podendo ainda formar-se a partir do oxigénio molecular por acção de radiação ultravioleta ou ionizante (Valko *et al.*, 2007).

2.1.2. Radical hidroxilo

O radical hidroxilo possui uma reactividade extremamente elevada, sendo, deste modo, considerado um dos radicais mais perigosos. Este radical pode formar-se a partir do radical anião superóxido e do peróxido de hidrogénio através das reacções de Fenton e de Haber-Weiss (Valko *et al.*, 2007):



Para além do Fe^{2+} outros iões metálicos, como o Cu^+ , Ti^{3+} ou Co^{2+} , podem reagir com o peróxido de hidrogénio levando ao aparecimento do radical hidroxilo contudo a reacção de Fenton ocorre em maior escala quando o metal de transição é o ferro (Buonocore *et al.*, 2010). Desta forma, a formação do radical hidroxilo *in vivo* está dependente da presença de Fe^{2+} livre e, portanto pode ser maior em portadores de condições fisiológicas que que contribuem para uma maior disponibilidade deste ião, como é o caso dos doentes com hemocromatose ou β -talassémia (Valko *et al.*, 2007).

O radical hidroxilo pode ainda ser também gerado através de uma série de outros mecanismos que incluem a decomposição da água através da radiação ionizante ou a decomposição fotolítica de alquilhidroxiperóxidos (Buonocore *et al.*, 2010).

2.1.3. Radical peroxilo

A propagação das reacções de lipoperoxidação lipídica (ver ponto 2.1.7) constituem a principal fonte de formação do radical peroxilo (ROO^\bullet), no entanto, este radical pode, igualmente, formar-se em sistemas não-lipídicos, tais como as proteínas. Além disso, a decomposição de peróxidos que pode ocorrer, quer por aquecimento, quer por catálise mediada por iões de metais de transição pode gerar a formação deste radical (Halliwell *et al.*, 1995).

2.1.4. Oxigénio singleto

O oxigénio molecular tem uma configuração electrónica única e é por si só um radical livre, uma vez que tem dois electrões desemparelhados. Contudo, devido às direcções paralelas de “spin” dos electrões desemparelhados, a reactividade do oxigénio molecular é muito baixa. No entanto, a reactividade do oxigénio pode ser aumentada pela inversão de “spin” de um dos seus dois electrões desemparelhados, que pode ocorrer através de um “input” de energia. Neste

processo forma-se o oxigénio singlete, que é altamente reactivo, podendo oxidar directamente proteínas, lípidos ou o DNA (Buonocore *et al.*, 2010).

2.1.5. Peróxido de Hidrogénio

O peróxido de hidrogénio pode surgir *in vivo* como resultado da dismutação do radical anião superóxido, por acção da enzima superóxido dismutase, ou por acção directa ou indirecta de outras enzimas, como, por exemplo, a glicolato oxidase ou os citocromos P450, respectivamente (Halliwell *et al.*, 1995; Parkinson, 1996). Também na actividade oxidativa dos peroxissomas se formam quantidades significativas deste composto (Valko *et al.*, 2007). O peróxido de hidrogénio pode atravessar as membranas biológicas e embora possa causar danos de forma directa, através da sua capacidade oxidante, exerce-os principalmente de forma indirecta quando serve como fonte de outras espécies reactivas de oxigénio ainda mais deletérias, como é o caso do radical hidroxilo (Halliwell *et al.*, 1995).

2.1.6. Fontes exógenas de espécies reactivas de oxigénio

Para além de poderem ser produzidas no decurso dos processos metabólicos aeróbios as ROS podem ser produzidas a partir de substâncias exógenas. Entre as fontes exógenas encontra-se a radiação ionizante e não ionizante e xenobióticos como os contaminantes ambientais ou os fármacos. Os xenobióticos podem ser directamente oxidantes, como é o caso do ozono, ou podem originar espécies reactivas de oxigénio no decurso da sua metabolização. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, o etanol, diversos compostos clorinados, compostos que induzam a proliferação de peroxissomas, pesticidas como, por exemplo, o paraquat, ou fármacos, como, por exemplo a doxorrubicina constituem exemplos de xenobióticos capazes de originar o aparecimento de ROS (Parkinson, 1996; Kohen & Nyska, 2002; Klaunig *et al.*, 2011).

A infecção por agentes patogénicos, tais como, bactérias ou vírus, pode, igualmente, resultar na produção de uma grande variedade de ROS através da libertação directa pelos invasores ou como resposta endógena induzida por fagócitos e neutrófilos (Klaunig *et al.*, 2011). Uma outra importante fonte de agentes oxidantes é a alimentação, uma vez que pode constituir um veículo de diferentes tipos de compostos oxidantes tais como peróxidos, aldeídos, ácidos gordos oxidados e metais de transição (Kohen & Nyska, 2002).

O “stress oxidativo” tem sido associado a diversas patologias, que surgem como resultado dos danos causados por estas espécies em moléculas biológicas importantes, como, por exemplo, os lípidos, as proteínas ou o DNA. Com efeito, são identificados na literatura mais de 200 distúrbios clínicos em que as ROS são importantes para a sua iniciação ou são produzidas no decurso da sua evolução (Kohen & Nyska, 2002). Assim, as ROS parecem estar envolvidas

na etiologia de diversos tipos de cancro, aterosclerose e outras doenças cardiovasculares, processo de inflamação e inflamação crónica, doenças do tracto intestinal, doenças neurodegenerativas, diabetes, doenças oculares, como as cataratas, patologias isquémica e pós-isquémica (danos na pele, cérebro, coração, rins, fígado e intestino). A acumulação de danos oxidativos que ocorre ao longo da vida está, também, associada ao processo natural de envelhecimento (revisto em Kohen & Nyska, 2002).

2.1.7. Interacção das espécies reactivas de oxigénio com os lípidos

As membranas celulares são extremamente vulneráveis a oxidação devido à sua elevada concentração em ácidos gordos poli-insaturados (Kohen & Nyska, 2002). A peroxidação lipídica é um processo bioquímico que envolve a oxidação dos ácidos gordos poli-insaturados como os componentes das membranas celulares (Chung *et al.*, 1996).

A peroxidação lipídica ocorre em três fases. A primeira fase, iniciação, envolve o ataque de uma espécie reactiva de oxigénio a um grupo metileno presente nos lípidos, separando-o assim de um átomo de hidrogénio. A presença de uma ligação dupla adjacente ao grupo metileno enfraquece a ligação entre o átomo hidrogénio e o átomo carbono, tornando assim a separação mais fácil (Kohen & Nyska, 2002; Haliwell & Chirico, 1993). Após a separação do hidrogénio, o ácido gordo com um electrão é estabilizado através do rearranjo da estrutura molecular formando um dieno conjugado. Em células aeróbias, devido à elevada concentração de oxigénio, ocorre então, a reacção entre este e o radical de ácido gordo formando o radical peroxilo. Segue-se então a fase de propagação, uma vez que o radical peroxilo formado é também capaz de separar átomos de hidrogénio dos ácidos gordos adjacentes, dando assim origem a um hidroperóxido e a outro radical ácido gordo levando, assim, à propagação da reacção. Deste modo, uma única iniciação pode resultar numa centena de conversão de ácidos gordos a hidroperóxidos lipídicos (Haliwell & Chirico, 1993).

Nem todos os ácidos gordos são capazes de sofrer peroxidação lipídica, ou seja ácidos gordos sem ligações duplas ou com apenas uma ligação dupla podem sofrer oxidação mas não o processo completo de peroxidação. A última fase da peroxidação, a terminação, ocorre quando o radical peroxilo reage com outro radical ou então com um antioxidante, que por ser capaz de parar este processo é caracterizado como um antioxidante capaz de quebrar reacções em cadeia. (Kohen & Nyska, 2002; Haliwell & Chirico, 1993).

Os danos que a peroxidação lipídica pode causar nas membranas biológicas podem conduzir à lise celular. Por outro lado, os hidroperóxidos resultantes destas reacções podem sofrer rearranjos e originar compostos capazes de reagir com diversas biomoléculas das células, incluindo o DNA, causando danos celulares, possuindo alguns deles, como, é o caso do

malonildialdeído (MDA) actividade cancerígena em ratos e mutagénica em células bacterianas e de mamíferos (Chung *et al.*, 1996).

Para além da lipoperoxidação de ácidos gordos poli-insaturados, foi igualmente descrito que as ROS podem modificar as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e, desta forma, contribuir para a patogénese da aterosclerose (Ryan e Aust, 1992).

2.1.8. Interacção das espécies reactivas de oxigénio com o DNA

Apesar do DNA ser uma molécula estável e bem protegida, as ROS conseguem interagir com ela e causar vários tipos de lesões, que incluem modificação das bases do DNA, quebra de uma ou das duas cadeias desta molécula, perda das bases com formação de locais apúricos/apirimidínicos, danos na desoxirribose, ligações cruzadas entre DNA e proteínas e ainda danos indirectos que resultam da perda de actividade dos sistemas enzimáticos de reparação do DNA (Møller & Wallin, 1998; Wang *et al.*, 1998; Kohen & Nyska, 2002).

O radical hidroxilo e o oxigénio singlete parecem ser capazes de lesar directamente o DNA, enquanto que, quer o radical anião superóxido, quer o peróxido de hidrogénio, não parecem causar directamente danos nesta molécula, estando a sua actividade mutagénica relacionada com o facto destes poderem levar ao aparecimento do radical hidroxilo, nomeadamente, através das reacções de Fenton e Harber-Weiss. Metais de transição, como o ferro, que possuem grande afinidade para com o DNA, podem catalisar a produção do radical hidroxilo nas proximidades desta molécula permitindo, assim, que esta seja facilmente lesada por estes radicais (Kohen & Nyska, 2002).

2.1.9. Interacção das espécies reactivas de oxigénio com as proteínas

As ROS podem reagir com as proteínas causando danos a resíduos específicos de aminoácidos, alterações da estrutura terciária, degradação e fragmentação, o que pode traduzir-se por perda da sua funcionalidade biológica e portanto a alterações da actividade enzimática celular. A susceptibilidade das proteínas depende da sua composição em aminoácidos e da importância que os aminoácidos mais susceptíveis têm na sua estrutura tridimensional e actividade catalítica. Os produtos mais comuns, resultantes da oxidação proteica são ceto-compostos e aldeídos (Kohen & Nyska, 2002).

2.2 Antioxidantes: Mecanismos de defesa contra o “stress” oxidativo

A exposição contínua ao “stress” oxidativo levou os organismos aeróbios a desenvolver mecanismos de protecção, que lhes permitam neutralizar os metabolitos reactivos que o provocam, antes que estes possam reagir com os alvos biológicos. Esses mecanismos de protecção, designados por antioxidantes, são assim substâncias, que quando presentes em baixas concentrações quando comparadas com os substratos oxidáveis, atrasam ou inibem significativamente a oxidação deste substrato, protegendo os alvos biológicos (Magalhães *et al.*, 2008).

Os antioxidantes podem ser classificados em dois grandes grupos: antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos (Steenvoorden *et al.*, 1997; Ratnam *et al.*, 2006). Alguns destes são de produção endógena e incluem enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPX) e a catalase, moléculas de baixo peso molecular, e co-factores enzimáticos. Muitos dos antioxidantes não enzimáticos são fornecidos pela alimentação, podendo ser divididos em várias classes, das quais os polifenóis constituem o maior grupo. As outras classes de antioxidantes alimentares incluem vitaminas, como o ácido ascórbico (vitamina C) ou o α -tocoferol (vitamina E), carotenóides, minerais e compostos organosulfurados (Ratnam *et al.*, 2006).

A actividade antioxidante exercida pelos compostos químicos pode resultar de diferentes mecanismos (Halliwell *et al.*, 1995; Prior *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008):

- Capacidade de sequestro de espécies reactivas através da transferência de um átomo de hidrogénio (mecanismo HAT de hydrogen atom transfer)
- Actividade redutora (mecanismo SET de single electron transfer)
- Capacidade de quelação de metais, em especial o Fe^{2+} e o Cu^+ , evitando, deste modo, a formação de radicais hidroxilo através das reacções de Fenton.
- Indução das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase ou glutathione peroxidase)
- Inibição de enzimas oxidativas como a xantina oxidase ou as ciclooxigenases.

2.2.1 Defesas endógenas

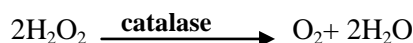
Os mecanismos endógenos de defesa contra as espécies reactivas de oxigénio abrangem dois tipos de actividades que podem ser divididas em directas e indirectas. Assim, enquanto que a abordagem indirecta pode envolver o controlo endógeno da produção de ROS através da alteração da actividade de certas enzimas, como, por exemplo, a xantina oxidase, cuja actividade catalítica leva à produção de ROS, a abordagem directa envolve a desactivação

destas espécies através de reacção com os antioxidantes endógenos (Kohen & Nyska, 2002). Conforme já referido anteriormente, dentro dos antioxidantes endógenos encontram-se as enzimas SOD, GPX e catalase.

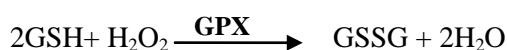
A superóxido oxidase (SOD), constitui uma das mais importantes defesas contra o “stress” oxidativo, e pode ser de diferentes tipos de conforme a sua estrutura e os seus co-factores (Ratnam *et al.*, 2006). A SOD-Cu-Zn (ou SOD1) é uma enzima dimérica que está amplamente distribuída no citoplasma das células eucariótas. A SOD-Mn (ou SOD2), pode ser encontrada nas células procariotas e nas mitocôndrias dos eucariotas. A SOD extracelular (EC-SOD ou SOD3) é uma glicoproteína contendo cobre e zinco. Nas plantas podem ainda encontrar-se formas desta enzima contendo o ferro como co-factor (Kohen & Nyska, 2002; Al-Gubory *et al.*, 2010). Todas estas enzimas catalisam a dismutação do radical anião superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio através da seguinte reacção (Al-Gubory *et al.*, 2010):



O H_2O_2 gerado pela dismutação pode ser removido através da actividade da enzima catalase e membros da família peroxidase incluindo a glutathiona peroxidase (Halliwell, 1996; Aherne & O’Brien, 2002; Ratnam *et al.*, 2006). A catalase é uma enzima única, que ocorre em grandes quantidades no organismo capaz de remover H_2O_2 quando este se encontra presente em concentrações elevadas. A enzima é composta por quatro subunidades proteicas e cada uma delas possui o ião férrico no grupo hemo, que sofre oxidação através da interacção com a primeira molécula de H_2O_2 para produzir Fe^{4+} numa estrutura chamada composto 1. A segunda molécula de H_2O_2 serve como um dador de electrões, resultando na destruição das duas moléculas de H_2O_2 envolvidos e na produção de uma molécula de oxigénio (Kohen & Nyska, 2002):



Ao contrário da catalase, a glutathiona peroxidase possui grande afinidade para com o H_2O_2 podendo removê-lo mesmo quando este se encontra presente em baixas concentrações. No entanto, o dador de electrões nesta reacção é a glutathiona, que passa da sua forma reduzida (GSH) para a oxidada (GSSH) (Kohen & Nyska, 2002):



As glutathionas peroxidases (GPX) constituem uma família de enzimas, contendo ou não selénio, que se encontram presentes no citoplasma e na mitocôndria das células eucariotas. A glutathiona reductase (GSR) catalisa a redução da forma oxidada da glutathiona (GSSG) para a forma reduzida (GSH), utilizando o NADPH como agente redutor, garantindo, deste modo, a manutenção dos níveis de GSH necessários para a manutenção do estado reduzido da célula (Al-Gubory *et al.*, 2010). Por sua vez NADPH, necessário para a actividade da GSR e para outras importantes funções celulares, é regenerado pela actividade da glucose-6-fosfato desidrogenase (Sorg, 2004).

A glutathiona (γ -Glutamylcysteinylglycine) é um tripeptídeo e constitui o principal antioxidante não enzimático celular. Além de ser um co-factor para actividade da GPX, no seu estado reduzido, a glutathiona, pode desactivar ROS e outras moléculas instáveis, quer por acção directa, quer através da enzima a glutathiona-S-transferase (GST) (Al-Gubory *et al.*, 2010).

Dentro dos antioxidantes não enzimáticos encontram-se as metalotioneínas que são pequenas proteínas com resíduos de cisteína capazes de quelar iões de metais de transição, evitando, assim, que ocorram as reacções de Haber-Weiss e Fenton, que levam à produção do radical hidroxilo. Além disso, a quelação destes iões pode, igualmente, funcionar como um mecanismo de destoxificação ao impedir que estes fiquem livres e, por isso, disponíveis para reagir com os seus alvos biológicos (Sorg, 2004).

A ubiquinol (coenzima Q₁₀) desempenha um papel essencial na cadeia mitocondrial de transporte de electrões ao estar envolvida na criação de um gradiente de protões entre os dois lados da membrana interna da mitocôndria. Este composto pode ser oxidado, funcionando como um eficiente sequestrador de radicais livres, especialmente na fase lipídica. O ácido lipóico, um componente do complexo piruvato desidrogenase, e a sua forma reduzida, ácido dihidrolipoico, são ambos quelantes de metais e sequestradores de ROS, além disso, o ácido dihidrolipoico recicla as vitaminas C e E. Assim, além do seu papel central no metabolismo energético, os ácidos lipóico e dihidrolipoico conseguem prevenir o “stress” oxidativo em diferentes fases (Sorg, 2004).

2.2.2. Antioxidantes exógenos

Existem múltiplas moléculas naturais, com propriedades antioxidantes, e, por isso, capazes de proteger os organismos das espécies reactivas de oxigénio, constituindo assim um sistema exógeno de defesa. Alguns destes compostos são veiculados pela dieta e podem agir como reforços úteis ao sistema protector endógeno (Ferreira & Abreu, 2007).

As vitaminas estão entre os antioxidantes alimentares capazes de sequestrar as ROS directamente, providenciando uma maior protecção contra os danos oxidativos causados por

estas. Os tocoferóis são uma classe de compostos químicos, à qual pertence a vitamina E. Podem ser classificados como tocoferóis ou como tocotrienóis, havendo em cada classe quatro isómeros (α , β , γ e δ), fazendo um total de oito isómeros de tocoferóis. Estes compostos encontram-se presentes, embora em pequenas quantidades, numa grande variedade de alimentos, encontrando-se em maiores concentrações nas frutas e outros vegetais (Gülçin, 2011). O α -tocoferol, ou vitamina E, é uma importante vitamina lipossolúvel, e é considerado o antioxidante mais importante deste grupo, encontrando-se presente nas membranas biológicas e nas lipoproteínas sendo capaz de inibir a peroxidação lipídica através do sequestro dos intermediários do radical peróxido (Kohen & Nyska, 2002; Halliwell, 1996; Gülçin, 2011).

O ácido L-ascórbico (vitamina C) é considerado um dos antioxidantes naturais mais poderosos e o menos tóxico. É uma vitamina solúvel em água e é encontrada em concentrações elevadas em vários alimentos e plantas. Além da sua capacidade antioxidante possui várias outras funções metabólicas (co-factor de enzimas como a prolina, a lisina e a dopamina- β -hidroxilase) (Halliwell, 1996). Como antioxidante o ascorbato é um sequestrador eficiente ou um antioxidante redutor capaz de doar os seus electrões às ROS, inactivando-as. A sua actividade demonstrou ser efectiva contra o radical anião superóxido, o peróxido de hidrogénio ou o oxigénio singlete (Kohen & Nyska, 2002; Gülçin, 2011).

Os carotenóides (moléculas terpenóides) são uma classe de compostos naturais lipossolúveis, sintetizados pelas plantas. São corantes naturais com pronunciada actividade antioxidante. As suas propriedades químicas estão intimamente ligadas a presença de um extenso sistema ligações duplas conjugadas. Os carotenóides mais importantes presentes na dieta são o β -caroteno, o licopeno, a luteína, a β -criptoxantina, a zeaxantina e astaxantina (Gülçin, 2011). Os carotenóides são sequestradores de radicais livres e conseguem, igualmente, desactivar o oxigénio singlete, sendo, esta última função, particularmente importante na retina, onde o oxigénio singlete é produzido mediante interacções entre a luz visível e o oxigénio (Sorg, 2004).

Outra importante classe de antioxidantes alimentares é a classe dos polifenóis. Estes compostos, que possuem um ou mais grupos hidroxilo ligados a um anel benzénico, são metabolitos secundários produzidos pelas plantas, onde se encontram envolvidos em diversos processos como o crescimento e a pigmentação, funcionando ainda como defesa contra microrganismos patogénicos, predadores ou contra situações de “stress” ambiental. As plantas comestíveis fornecem a dieta humana mais de 8000 diferentes polifenóis (Gülçin, 2011).

Os compostos fenólicos englobam: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos ou ácidos hidroxicinâmicos), flavonóides (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianinas e

isoflavonóides), estilbenos, cumarinas e taninos, tendo os flavonóides e os ácidos fenólicos maior relevância no seu poder antioxidante (Figura 2.2) (Ferreira & Abreu, 2007).

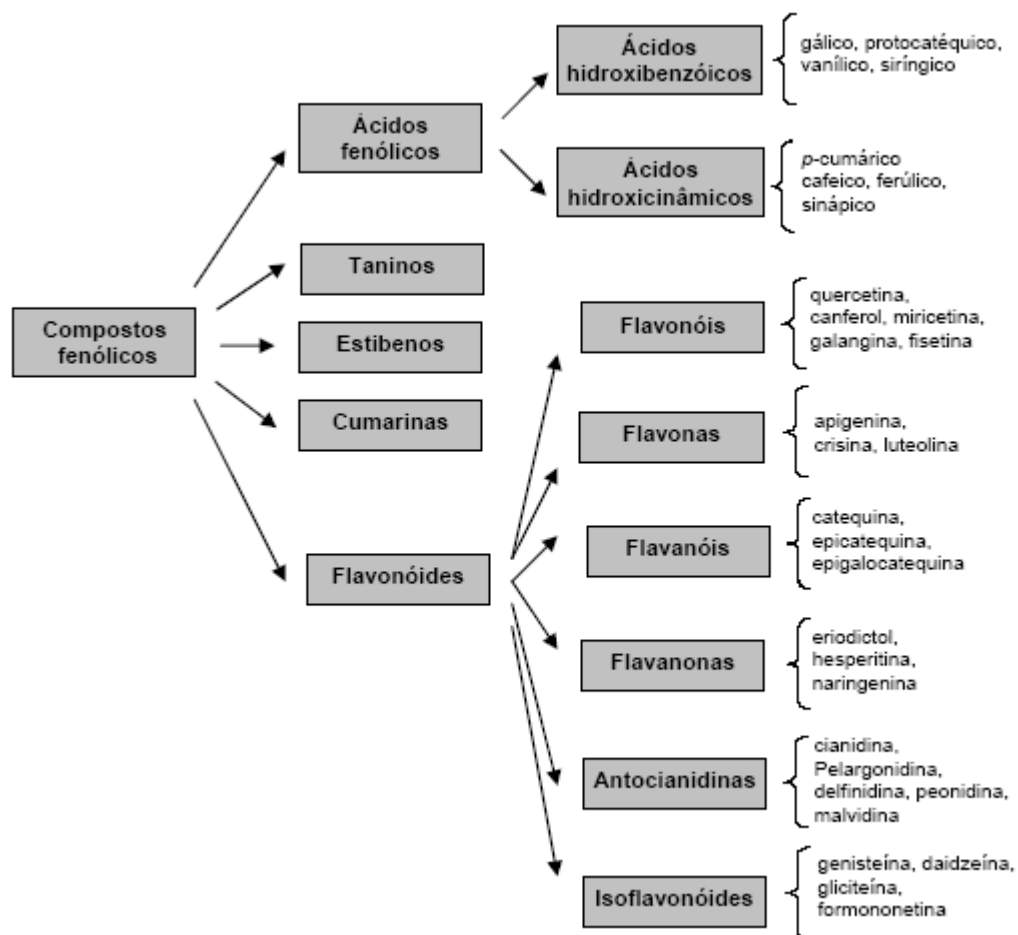


Figura 2.2- Principais classes de compostos fenólicos (Ferreira e Abreu, 2007).

Os flavonóides são um grupo de compostos fenólicos com características e estruturas químicas diversas. Ocorrem naturalmente em frutos, vegetais, sementes e flores que são parte integrante da dieta humana. Diversos destes flavonóides têm sido caracterizados como detentores de várias actividades biológicas relevantes, que incluem actividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antialérgica, antioxidante antiestrogénica e antiproliferativa (Cook & Samman, 1996; Harborne & Williams, 2000; Ross & Kasum, 2002).

Os flavonóides em conjunto com outros antioxidantes, incluindo as vitaminas C e E, são capazes de inibir a peroxidação lipídica, causada pelas ROS, nas membranas celulares. Ao contrário das vitaminas C e E que estão concentradas nas fases aquosa ou lipídicas,

respectivamente, os flavonóides conseguem abranger ambas as fases devido às suas características de solubilidade (Ross & Kasum, 2002).

A inibição da peroxidação lipídica é considerada uma das mais importantes reacções associadas à capacidade antioxidante dos flavonóides. Normalmente os antioxidantes designados como antioxidantes de quebra de reacção em cadeia inibem ou retardam as reacções em cadeia da peroxidação lipídica ao interferirem na propagação da reacção em cadeia. Os flavonóides ao doar um átomo de hidrogénio ao ácido gordo ou ao radical ácido gordo, conseguem inibir a reacção na fase de iniciação (Galleano *et al.*, 2010).

A capacidade dos ácidos fenólicos, e dos seus derivados, depende do número e da posição dos grupos hidroxilo ligados ao anel aromático, do sítio de ligação e da posição relativa dos grupos ligados e do tipo de substituintes (Rice-Evans *et al.*, 1996). Existem dois principais grupos dentro dos ácidos fenólicos: o grupo dos ácidos hidroxibenzóicos e o grupo dos ácidos hidroxicinâmicos. Estes são caracterizados como detentores de maior capacidade antioxidante do que os primeiros, devido à presença do grupo $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$ que confere maior poder antioxidante que o grupo COOH presente nos ácidos benzóicos. A presença de diferentes substituintes no esqueleto da estrutura fenólica tem também influência nas suas propriedades antioxidantes, em particular na sua capacidade de doação de átomos de hidrogénio (Gülçin, 2011).

Vários outros compostos presentes naturalmente nas plantas utilizadas na alimentação humana têm vindo a demonstrar possuir forte actividade antioxidante. Dentro destes encontram-se compostos azotados, como os derivados da clorofila, alcalóides e compostos organossulfurados, como compostos de enxofre alílicos, índoles e isotiocianatos (Ferreira & Abreu, 2007).

2.3 A alimentação como fonte de compostos mutagénicos e carcinogénicos

Ao mesmo tempo que pode funcionar como uma fonte de compostos potencialmente benéficos para a saúde, a alimentação, pode, igualmente, constituir uma fonte de exposição a compostos potencialmente mutagénicos e/ou carcinogénicos, isto é, a compostos que podem induzir mutações no DNA e/ou podem favorecer o desenvolvimento de tumores (Antunes & Araújo, 2000).

Os compostos químicos capazes de lesar o DNA são, normalmente, compostos electrofílicos, ou que geram metabolitos electrofílicos, capazes de reagir com esta molécula alterando a sua estrutura (Miller e Miller, 1986). Dependendo dos genes em que ocorrem e do tipo de alteração que provocam, as mutações podem causar maior ou menor perturbação ao funcionamento celular. Em particular, quando ocorrem nos genes envolvidos no processo de

divisão celular ou nos genes responsáveis pela manutenção da integridade do DNA, as mutações podem conduzir ao aparecimento de tumores (Bishop, 1991).

A cancerigénese é caracterizada por ser um processo complexo que envolve uma série de etapas individuais entre as quais se encontram as mutações. A estreita correlação que se verifica, assim, entre os processos de mutagénese e de cancerigénese levou a que os ensaios de mutagenicidade desempenhem um papel fundamental na identificação de compostos químicos potencialmente cancerígenos. No entanto, nem todos os cancerígenos são mutagêneos, pois existem compostos que podem provocar a indução de neoplasias e alterar o funcionamento da célula, através de outros processos que não envolvam a mutagénese, tais como, alterações hormonais, no caso, dos tumores hormono-dependentes, ou processos que envolvam a ligação a determinados receptores celulares (Belizário, 2002). As mutações nas células somáticas não estão apenas envolvidas no processo de cancerigénese, mas desempenham, igualmente, um papel importante no desenvolvimento de outras doenças crónico-degenerativas, tais como aterosclerose e as doenças cardíacas, que são das principais causas de morte na população humana (De Flora, 1998).

Exemplos de constituintes alimentares naturais que têm demonstrado actividade mutagénica/carcinogénica estão os compostos safrole, estragole e metileugenol existentes nas especiarias (Ames, 1983) ou os alcalóides de pirrolizidina presentes em várias espécies de plantas e que podem, por isso, contaminar alimentos como a carne, o leite ou os chás (Ames, 1983; Asres *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2008). Para além destes os alimentos podem ainda conter contaminantes, quer de origem natural, como, por exemplo, a micotoxina aflatoxina B₁, ou de origem antropogénica, como, por exemplo os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, igualmente, capazes de gerar *in vivo* metabolitos com actividade mutagénica/carcinogénica (Ames, 1983; Goldman & Shields, 2003).

Para além de poderem aparecer nos alimentos devido a serem contaminantes ambientais, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos podem formar-se nos alimentos no decurso da sua conservação por processos de fumagem ou em carne e peixe confeccionados a temperaturas elevadas (Goldman & Shields, 2003). A confecção de carne de vertebrados a temperatura elevada pode igualmente, originar a formação de amins aromáticas heterocíclicas, sendo algumas delas mutagénicas e possivelmente cancerígenas. Estes compostos formam-se devido à pirólise dos aminoácidos, através de reacções entre os aminoácidos e açúcares na presença de creatinina. As *N*-nitrosaminas são outra classe de agentes carcinogénicos presentes nos alimentos, em especial nas carnes curadas (Goldman & Shields, 2003). A sua formação nestes alimentos resulta das reacções de nitrosação que ocorrem entre o ião nitrito, utilizado como conservante deste tipo de carnes, e as amins secundárias e terciárias que se encontram, por exemplo, nos aminoácidos. Para além de poderem aparecer já formadas nos alimentos, as *N*-

nitrosaminas podem ainda formar-se endogenamente no estômago, a partir de precursores, tais como o ião nitrito e os aminoácidos, presentes nos alimentos (Miller & Miller 1986).

Ao mesmo tempo que representa uma fonte de compostos com reconhecida actividade mutagénica/cancerígena, a dieta humana pode, igualmente, conter componentes capazes de diminuir o risco de cancro (antimutagénicos). Segundo De Flora (1998), existem vários mecanismos através dos quais os compostos podem exercer actividade antimutagénica, entre os quais se destaca a inibição da absorção de mutagénicos, a inibição da formação endógena de mutagénicos ou o favorecimento da absorção de compostos protectores, o sequestro de ROS, a modulação do metabolismo de xenobióticos levando à inibição das enzimas envolvidas na sua bioactivação ou à indução das envolvidas na sua destoxificação ou a estimulação dos processos de reparação do DNA (De Flora, 1998).

As fibras alimentares podem ser consideradas antimutagénicos alimentares uma vez que reduzem a concentração de compostos mutagénicos no intestino, bem como o seu tempo de permanência, diminuindo o tempo de exposição da mucosa intestinal a esses compostos e reduzindo a possibilidade da sua absorção. Mais ainda, estas fibras podem adsorver compostos mutagénicos, como, por exemplo, as aminas heterocíclicas, impedindo, também desta forma, a sua absorção. A inibição das reacções de nitrosação ou das enzimas oxidativas são dois exemplos de processos que podem diminuir a formação endógena de mutagénicos. O ácido ascórbico, assim como diversos polifenóis têm mostrado conseguir inibir a formação endógena de *N*-nitrosaminas em animais de laboratório (De Flora, 1998; Ferguson, 2001).

Os compostos organosulfurados, presentes em alimentos como o alho e a cebola, ou os isotiocianatos, presentes em crucíferas como a couve-flor ou os brócolos, têm, igualmente, mostrado actividade antimutagénica e anticancerígena em animais de laboratório. O modo de acção destes compostos parece estar relacionado com a alteração do metabolismo de cancerígenos, induzindo as enzimas envolvidas na sua destoxificação, como é o caso da glutatíon-*S*-transferase, e inibindo as enzimas envolvidas na sua activação, nomeadamente algumas formas dos citocromos P450. Também alguns polifenóis e vitaminas têm demonstrado exercer este mecanismo de actividade antimutagénica. Ao impedirem a formação de espécies oxidativas ou ao exercerem a sua desactivação antes que estas possam causar lesões nos componentes celulares, os compostos com actividade antioxidante, podem igualmente apresentar actividade antimutagénica. (De Flora, 1998; Ferguson, 2001).

3. Materiais e Métodos

3.1 Caracterização das infusões das plantas medicinais

Na realização deste trabalho foram analisados as infusões de cinco plantas ou partes de plantas medicinais: barbas de milho, carqueja, dente de leão, folhas de oliveira e urtiga-branca. As amostras utilizadas foram adquiridas comercialmente em ervanárias e/ou parafarmácias.

3.1.1 Infusão de barbas de milho

A infusão de barbas de milho (Figura 3.1) foi preparada a partir dos estigmas da planta do milho. Caracteriza-se por uma cor castanho-claro e um aroma doce e suave.



Figura 3.1- Aspecto das barbas de milho e da respectivo infusão.

3.1.2 Infusão de carqueja

A infusão da carqueja (Figura 3.2) foi preparada a partir de uma mistura das folhas e flores. Caracteriza-se por uma cor amarelo-claro e por um aroma suave.



Figura 3.2- Aspecto da carqueja e da respectiva infusão.

3.1.3 Infusão de dente de leão

A infusão do dente de Leão (Figura 3.3) foi preparada a partir de uma mistura das raízes e folhas. Possui uma cor castanho-escuro e um aroma intenso.



Figura 3.3- Aspecto do dente de leão e da respectiva infusão.

3.1.4 Infusão de folhas de oliveira

A infusão das folhas de oliveira (Figura 3.4) foi preparada apenas com as folhas. Caracteriza-se por uma cor amarelo-esverdeado e por um aroma a óleo mas pouco intenso.



Figura 3.4- Aspecto das folhas de oliveira e da respectiva infusão.

3.1.5 Infusão de urtiga-branca

A infusão da urtiga-branca (Figura 3.5) foi preparada a partir de uma mistura das folhas, caules e raízes. Possui uma cor castanho-escuro e caracteriza-se por um cheiro forte e intenso.



Figura 3.5- Aspecto da urtiga branca e da respectiva infusão

3.2 Reagentes e meio de cultura

Na realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e meios de cultura: acetato de amônio (Riedel-de Haën, 98%), acetato de sódio trihidratado (Panreac, 99%), ácido acético (Panreac, 99%), ácido ascórbico (Panreac, 99%), ácido gálico (Merck, 99,5%), ácido tiobarbitúrico (TBA) (Acros, 98%), ácido tricloroacético (Riedel-de Haën, 99,5%), álcool etílico (Riedel-de Haën, 99%), 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) dihidroclorato (AAPH) (Aldrich, 97%), azul de nitrotetrazólio (NBT²⁺) (Sigma), Bacto agar (Becton Dickinson and Company), biotina (Sigma Aldrich, 99%), carbonato de sódio (VReis), cloreto de cobre (II) bihidratado (Riedel-de Haën, 99%), cloreto de sódio (Panreac, 99,5%), cloreto de alumínio (Fluka, 99%), cloreto férrico hexahidratado (Merck, 99%), desoxirribose (Sigma, 99%), dihidrogenofosfato de potássio (Merck, 99,5%), dihidrogenofosfato de sódio (Panreac, 98%), dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) (Sigma, 97%), etanol (Riedel-de Haën, 99,8%), fluoresceína (Fluka), ferricianeto de potássio dihidratado (Anala R, 99%), glucose monohidratada (Panreac), hidrogenofosfato de dipotássio (BDH Chemicals Lda, 97,5%), hidróxido de sódio (Merck, 99%), histidina (Merck, 99%), meio de cultura Nutrien Broth (NB) n°2 (Oxoid), metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma, 90%), neocuproína (Sigma), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Panreac, 30%), quercetina (Sigma), reagente de Folin-Ciocalteu (Panreac), sal dissódico de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) (Panreac, 99%), sulfato de cobre pentahidratado (Riedel-de Haën, 99%), sulfato de magnésio heptahidratado (Merck, 99,5%), sulfato ferroso heptahidratado (Riedel-de Haën, 99, *tert*-butil- hidroperóxido (t-BHP) (Sigma-Aldrich, 70% em H₂O), tripiriditriazina (TPTZ) (Fluka, 99%) e trolox (Acros Organics, 97%). Na preparação de todas as soluções, diluições e meios de cultura utilizou-se sempre água ultra-pura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

3.3 Preparação das infusões das plantas medicinais

Foram utilizados dois métodos diferentes para a preparação das amostras. No primeiro método adicionaram-se 100 mL de água em ebulição a 5g da amostra. Esta mistura foi tapada com um vidro de relógio permanecendo depois 15 minutos sob agitação magnética. Findo este tempo as amostras foram filtradas, primeiro através de um filtro de papel (Whatman n°1) e, depois, por membranas estéreis Millipore Millex GP com poro de 0.22 µm. Esta segunda filtração foi realizada numa câmara de fluxo laminar, garantindo assim a esterilidade das amostras. Ainda nesta câmara, os chás filtrados e esterilizados foram distribuídos em tubos “eppendorf” estéreis (1,5mL de chá em cada tubo) e conservados a -60°C.

No segundo método adicionaram-se 100 mL de água fria a 5 g de cada planta. Cobriu-se a mistura com um vidro de relógio e colocou-se a aquecer sob agitação magnética. Quando a água entrou em ebulição deixou-se ferver durante três minutos e, de seguida, retirou-se do aquecimento e deixou-se ficar a mistura mais 15 minutos sob agitação magnética. As amostras foram então filtradas, esterilizadas, alíquotadas e conservadas da forma já descrita para o primeiro método.

3.4 Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu foi originalmente desenvolvido em 1927, a partir de reagentes químicos usados para análises de tirosina, na qual a oxidação de fenóis pelo reagente molibdotungstato originava um produto corado com um máximo de absorção a um comprimento de onda (λ) entre os 745 e os 750 nm. Apesar de ser um método simples, sensível e preciso, devido ao facto de ser realizado a pH ácido esta reacção era lenta e pouco específica (Prior *et al.*, 2005). Singleton e Rossi propuseram uma melhoria ao método com o reagente heteropolianião molibdotungstenoiofosfórico capaz de reduzir fenóis de forma mais específica, sendo o λ max para o produto aos 765 nm. (Prior *et al.*, 2005; Singleton *et al.*, 1999).

O ensaio de Folin-Ciocalteu consiste assim, na redução, a pH alcalino do heteropolianião molibdotungstenoiofosfórico do reagente de Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos (sob a forma de ião fenolato) da amostra. Esta reacção origina um produto de coloração azul com um máximo de absorção a 765 nm, sendo a sua intensidade proporcional ao teor em compostos fenólicos presentes na amostra (Prior *et al.*, 2005; Singleton *et al.*, 1999). Este método é simples, sensível e preciso mas pode sofrer interferências de outros componentes da amostra que possam igualmente reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu, tais como, açúcares, aminas aromáticas, dióxido de enxofre ou ácido ascórbico (Prior *et al.*, 2005; Singleton *et al.*, 1999).

A determinação dos compostos fenólicos totais, baseou-se essencialmente no método descrito por Kosar e colaboradores (2008) com algumas modificações.

Para a determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se o método descrito por Kosar e colaboradores (2008) com algumas modificações. Assim, em balões volumétricos de 10 mL, contendo cerca 6 mL de água ultra-pura, adicionou-se o volume adequado das amostras e 500 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu sem diluição. Deixou-se um minuto à temperatura ambiente, adicionou-se 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio a 20% (peso/volume) e perpez-se o volume a 10 mL com água ultra-pura. As amostras foram então incubadas durante 2 horas, a 25°C e no escuro. Terminado este tempo foi possível observar o aparecimento de uma coloração azul. Procedeu-se então à medição da absorvância das amostras num

espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 765 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água.

Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma recta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 50 e os 500 mg/L. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro de infusão.

3.5 Quantificação dos Flavonóides Totais

Esta determinação baseia-se no facto de, em meio alcoólico, ocorrer a formação de complexos estáveis entre o alumínio e os flavonóides, que levam a um desvio para comprimentos mais elevados do máximo de absorção destes compostos. Dessa forma, é possível determinar a quantidade de flavonóides evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. Os ácidos fenólicos, apesar de formarem complexos com cloreto de alumínio, absorvem em comprimentos de onda menores (Lianda e Castro, 2008). O método pode ser pouco exacto, uma vez que, o valor de flavonóides por ele determinado pode ser diferente (geralmente inferior) ao valor real de flavonóides totais presentes na amostra analisada. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóis na amostra devido ao comprimento de onda seleccionado (425 nm) corresponder à banda de absorção do complexo quercetina-Alumínio. Assim, os complexos flavanonas e flavonóis com o alumínio que absorvem na gama dos 310-320 nm não contribuem, por isso, para a absorvância a 425 nm (Popova *et al.*, 2004).

O teor em flavonóides foi analisado de acordo com o método descrito por Popova e colaboradores (2003), com pequenas adaptações. Assim, em balões de 10 mL misturaram-se as amostras, ou suas diluições, com 400 µL de uma solução 20 g/L de cloreto de alumínio em etanol e completou-se o volume com etanol. Para todas as amostras foram preparados os respectivos brancos sem adição de cloreto de alumínio. Após uma incubação de 40 minutos, no escuro e à temperatura ambiente mediu-se a absorvância a 425 nm (espectrofotómetro SPEKOL 1500) de todas as amostras contra o respectivo branco. A concentração em flavonóides foi determinada por interpolação de uma recta de calibração preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções alcoólicas de quercetina com concentrações entre 1 e os 10 mg/L (concentrações finais). Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de quercetina por litro de infusão.

3.6 Determinação da actividade antioxidante das diferentes infusões medicinais

3.6.1 Determinação da actividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

O ensaio FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power) consiste na determinação da capacidade da amostra para reduzir o Fe(III) a Fe(II), medindo assim a capacidade redutora da amostra. Quando o Fe(III) do complexo de Fe(III)- tripiriditriazina (Fe^{3+} -TPTZ) é reduzido a Fe(II) forma-se, em meio ácido, uma intensa coloração azul susceptível de ser quantificada espectrofotometricamente a 593 nm e que é proporcional à quantidade de espécies redutoras (mecanismo antioxidante SET) presentes na amostra (Figura 3.6) (Benzie & Strain, 1996).

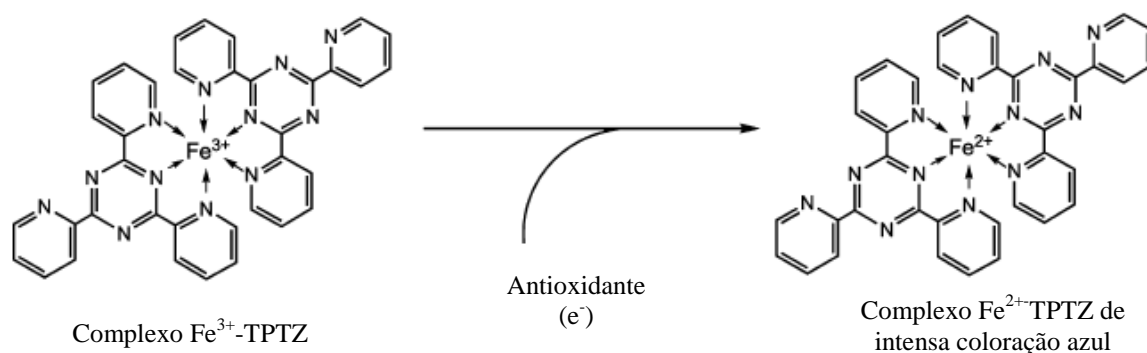


Figura 3.6 - Formação do complexo (Fe^{2+} -TPTZ) após redução do Fe^{3+} por um antioxidante (adaptado de Prior *et al*, 2005).

Para a realização do ensaio FRAP seguiu-se o método descrito por Ramful e colaboradores (2010) com algumas modificações. Assim, num tubo de ensaio adicionou-se 100 (ou 100-x) μL de cada uma das amostras, com 300 (ou 300+x) μL de água e 3 mL de reagente FRAP (Tabela 3.1) preparado de fresco e pré-aquecido a 37°C.

Tabela 3.1 - Composição do reagente FRAP (Ramful *et al.*, 2010).

Reagentes	Quantidade
Tampão acetato 0.25 M pH 3,6	200 mL
TPTZ 10 mM em HCl 40 mM	20 mL
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM	20 mL

Os tubos foram incubados 4 minutos a 37°C. Durante esta incubação foi possível visualizar o aparecimento de uma coloração azul, cuja intensidade variava entre as várias

amostras, e que foi quantificada por leitura da absorvância a 593 nm num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) utilizando como branco a absorvância do reagente FRAP (Tabela 3.1).

As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a actividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma recta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de sulfato ferroso com concentrações entre os 0 e os 1,25 mM. Os resultados foram expressos em mmol de Fe^{2+} /L de amostra.

3.6.2 Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC

O método CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) consiste na redução do Cu(II) para Cu(I) por acção de redutores (antioxidantes) presentes numa amostra. A forma reduzida do complexo Cu-neocuproína (Cu(I)-neocuproína) apresenta uma coloração intensa com um máximo de absorção a 450 nm. Assim, a redução da forma oxidada deste complexo (Cu(II)-neocuproína) pelos compostos da amostra pode ser determinada espectrofotometricamente através da leitura da absorvância a 450 nm (Apak *et al.*, 2004).

A realização do ensaio CUPRAC foi efectuada de acordo com o método descrito por Apak e colaboradores (2004) com algumas adaptações. Assim, num tubo de ensaio juntou-se 1 mL de cada uma das seguintes soluções: cloreto de cobre (II) bihidratado 10 mM, acetato de amónio 1 M, neocuproína 7,5 mM em etanol. Em seguida, adicionou-se a amostra (volumes entre 10 e 30 μL), e completou-se a 4100 μL com água. Os tubos foram incubados durante 1 hora à temperatura ambiente procedendo-se então à leitura da absorvância (espectrofotómetro SPEKOL 1500) a 450 nm, utilizando como branco a mesma mistura com 1,1 mL de água em vez da amostra.

As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a actividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma recta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por 1,1 mL das soluções padrão de ácido ascórbico (15,625; 31,25; 62,5; 125; e 250 μM). Os resultados foram expressos em μmol equivalentes de ácido ascórbico/L de amostra.

3.6.3 Determinação da capacidade de quelação de Fe (II)

A capacidade de quelação do ferro pode ser encarada como um mecanismo de actividade antioxidante, devido a este metal poder estar envolvido na formação de espécies reactivas de oxigénio através das reacções de Fenton (Huang *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008). Esta capacidade pode ser avaliada com base na possibilidade da ferrozina formar com o Fe(II) complexos vermelhos $[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4+}$, com um máximo de absorção a 562 nm. Na presença de agentes quelantes a formação destes complexos é dificultada o que resulta numa diminuição

da intensidade da cor. Desta forma, a medição da diminuição da intensidade da absorção a 562 nm permite efectuar uma estimativa da capacidade de quelação do ferro da amostra (Geckil *et al.*, 2005).

A capacidade de quelação de ferro foi avaliada de acordo com a técnica descrita por Lima e colaboradores (2010). Assim, as misturas reaccionais foram preparadas misturando diferentes volumes de amostra, ou de suas diluições, com 20 µL de uma solução FeSO₄.7H₂O (0,2 mM). Após uma incubação de cinco minutos à temperatura ambiente adicionaram-se 80 µL de ferrozina (5 mM), ajustou-se o volume a 600 µL com água, agitou-se vigorosamente a mistura obtida e incubou-se durante 10 minutos também à temperatura ambiente. Terminada esta segunda incubação, leu-se a absorvância a 562 nm no espectrofotómetro (SPEKOL 1500). Realizaram-se igualmente um controlo negativo, substituindo a amostra por igual volume de água (solvente da amostra); e um controlo de interferência da cor da amostra, utilizando igual volume de amostra e completando a 600 µL com água.

A percentagem de inibição da formação dos complexos [Fe(Ferrozina)₃]⁴⁻ foi calculada através da seguinte equação:

$$\% \text{Inibição} = [(Abs_{\text{controlo negativo}}) - (Abs_{\text{amostra com ferrozina}} - Abs_{\text{amostra sem ferrozina}}) / (Abs_{\text{controlo negativo}})] \times 100$$

Com os vários valores de % Inibição em função da concentração da amostra determinou-se o valor de IC₅₀, ou seja, a concentração de amostra que provoca 50% de inibição da formação dos complexos de ferro.

3.6.4 Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detectada pela diminuição da formação de formazano

O radical anião superóxido reage com o azul nitrotetrazólio (NBT²⁺), reduzindo-o a formazano (Figura 3.7), um composto azul que apresenta um máximo de absorção a 560 nm. Qualquer molécula capaz de sequestrar o radical superóxido conduz a uma diminuição na velocidade de redução do NBT, ou seja, uma diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm (Halliwell *et al.*, 1995).

Neste ensaio, o radical anião superóxido foi gerado pelo sistema metossulfato de fenazina (PMS) e NADH, em que, o PMS após ser reduzido pelo NADH, reage com o oxigénio produzindo o radical anião superóxido (Nakamura *et al.*, 1992). Tendo em conta que o radical anião superóxido resulta da redução do oxigénio molecular e pode surgir no decurso de diversos processos metabólicos, uma das vantagens deste ensaio é a de se utilizar um oxidante com relevância fisiológica (Magalhães *et al.*, 2008).

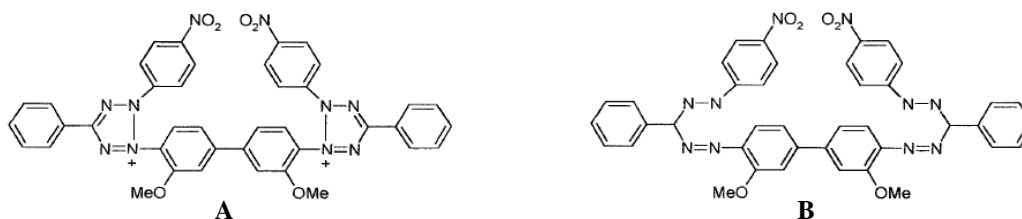


Figura 3.7 - Estrutura do (A) NBT^{2+} e do (B) formazano.

A capacidade das amostras para sequestrar o radical anião superóxido foi avaliada de acordo com o método descrito por Valentão e colaboradores (2001) com pequenas adaptações. Assim, em cuvetes do espectrofotómetro adicionaram-se diferentes volumes de amostras ou das suas diluições, de forma a testar diferentes concentrações, e completou-se com água até 200 μL . Em seguida adicionaram-se 300 μL de NADH 1,66 mM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4), 300 μL de NBT^{2+} 430 μM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) e por fim tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) para completar a 2 950 μL . A reacção iniciou-se com a adição de 50 μL de PMS 162 μM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) tendo-se acompanhado a variação da absorvância a 560 nm, durante dois minutos à temperatura ambiente. Realizou-se, igualmente, um ensaio controlo substituindo a amostra por igual volume de solvente da amostra (água). As determinações foram realizadas em triplicado, no espectrofotómetro (SPEKOL 1500). A percentagem de inibição da redução do NBT^{2+} de cada uma das concentrações das amostras foi calculada em relação ao controlo utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = \left[\frac{(\text{Variação}_{\text{absorvância do controlo}} - \text{Variação}_{\text{absorvância da amostra}})}{(\text{Variação}_{\text{absorvância do controlo}})} \right] \times 100$$

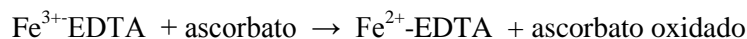
Em seguida foram construídas curvas de percentagem de inibição *versus* concentração de forma a determinar a concentração de chá que provocou 50% de inibição da redução do NBT^{2+} , ou seja, o valor de IC_{50} .

3.6.5 Determinação da capacidade de sequestro do radical hidroxilo através do ensaio de degradação da desoxirribose

A degradação da desoxirribose pelo radical hidroxilo (OH^{\bullet}) leva à formação de diversos produtos, entre os dos quais se encontra o malonildialdeído (MDA), que em meio ácido e a temperatura elevada, reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) dando origem a compostos cor-de-rosa passíveis de serem quantificados espectrofotometricamente por medição da absorvância a 532 nm (Halliwell *et al.*, 1995). Se à mistura reaccional se adicionar um composto capaz de sequestrar os radicais hidroxilo, ou de prevenir a sua formação por desactivação do H_2O_2 (ver abaixo), verifica-se uma menor extensão da degradação da desoxirribose e, consequentemente, uma diminuição da absorvância a 532 nm. O radical hidroxilo é uma das espécies reactivas de

oxigénio que pode formar-se *in vivo* e, desta forma, uma das vantagens deste ensaio é a de se utilizar um oxidante com relevância fisiológica.

Os radicais hidroxilo, necessários para esta reacção, foram gerados através da reacção entre o peróxido de hidrogénio, o Fe^{2+} , adicionado sob a forma de Fe^{3+} na presença de EDTA, e do ácido ascórbico, necessário para reduzir o ferro e iniciar a reacção (reacção de Fenton):



A formação do complexo Fe-EDTA evita a formação de complexos entre o ferro e as substâncias presentes nas misturas de ensaio, a desoxirribose ou o ácido ascórbico, não impedindo a participação do ferro na reacção de Fenton (Chobot, 2010). Quando o ensaio é realizado na ausência de EDTA a desoxirribose pode quelar o Fe(III) o que leva a uma ainda maior degradação desta molécula, devido à formação “site specific” dos radicais hidroxilo (Chobot, 2010).

A capacidade das amostras para sequestrar o radical hidroxilo foi avaliada de acordo com o método descrito por Gaspar e colaboradores (1996) com pequenas adaptações. As determinações foram realizadas em triplicado, num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 532 nm. Num tubo de ensaio juntou-se pela seguinte ordem: 690 μL de tampão de fosfatos de potássio (15 mM e pH 7,4), 100 μL de amostra, 100 μL de desoxirribose (28 mM), 50 μL de H_2O_2 (28,4 mM), 50 μL de solução de $\text{FeCl}_3/\text{EDTA}$ (FeCl_3 400 μM dissolvido em 2mM de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e por fim, 10 μL de ácido ascórbico 5 mM, atingindo assim um volume final de 1 mL. Esta mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora. Após esse período, adicionou-se 1 ml de solução de TBA (1% p/v em NaOH 50 mM) e 1 ml de ácido tricloroacético (2,8% p/v). A solução resultante foi aquecida durante 15 minutos em banho de água a 100°C. Findo este tempo deixou-se a amostra arrefecer e leu-se a absorvância a 532 nm. Realizou-se, igualmente, um branco, contendo todos os componentes da mistura reaccional substituindo a desoxirribose por igual volume de água, para verificar a existência de produtos TBA reactivos provenientes de contaminantes presentes no material ou reagentes, e um controlo positivo, contendo todos os componentes da mistura reaccional substituindo a amostra por igual volume de água.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da formação de produtos reactivos face ao TBA relativamente ao controlo positivo, calculada utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = [(\text{Absorvância}_{\text{controlo positivo}} - \text{Absorvância}_{\text{amostra}}) / (\text{Absorvância}_{\text{controlo positivo}})] \times 100$$

3.6.6 Determinação da capacidade de sequestro do radical peroxilo detectada pelo ensaio ORAC

O ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) mede a capacidade dos antioxidantes para inibir as oxidações induzidas pelo radical peroxilo, reflectindo assim a clássica actividade antioxidante que consiste na inactivação de oxidantes através da transferência de um átomo de hidrogénio (HAT) (Prior *et al.*, 2005). Este ensaio mede a capacidade da amostra para inactivar o radical peroxilo, produzido pelo 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorato (AAPH) a 37 °C (Figura 3.7). Esta capacidade é avaliada através da determinação da inibição da oxidação da fluoresceína induzida por estes radicais. Uma vez que os produtos resultantes da oxidação da fluoresceína não são fluorescentes, a incubação deste fluorómetro na presença de uma fonte de radicais peroxilo leva a uma diminuição imediata da fluorescência. Quando esta incubação se processa na presença de um antioxidante, estes podem desactivar o radical peroxilo, por transferência de um átomo de hidrogénio, verificando-se um período de latência antes de se iniciar a diminuição da fluorescência. Esse período de latência é tanto maior quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra e pode ser medido pela área sob a curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo (Figura 3.8) (Ou *et al.*, 2001).

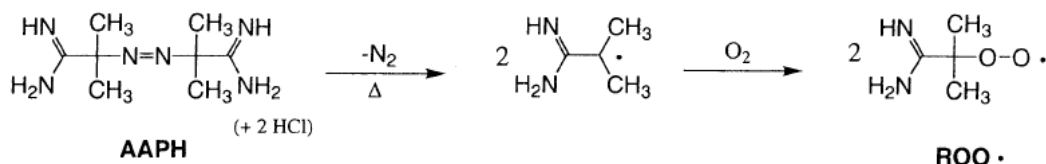


Figura 3.8 – Reacção de oxidação do AAPH (Dunlap *et al.*, 2003).

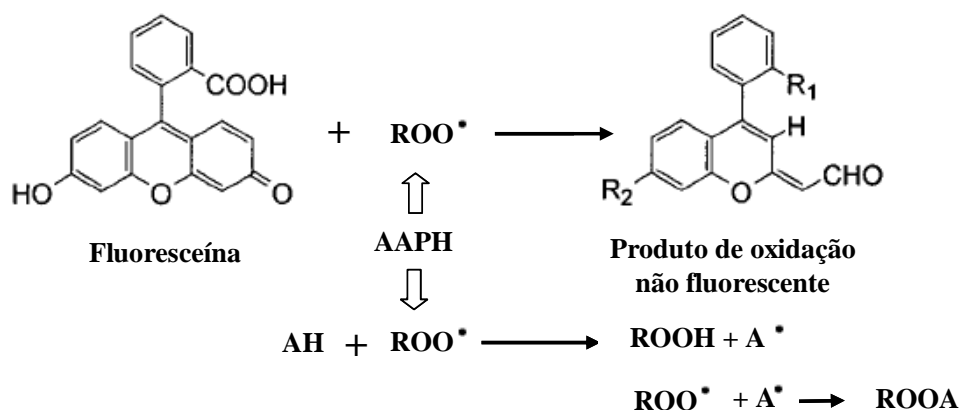


Figura 3.9- Esquema das reacções elementares ocorridas no ensaio ORAC. O AAPH produz os radicais peroxilo que oxidam a fluoresceína. Na presença de um antioxidante (AH), este desactiva o radical peroxilo, dando origem a compostos não reactivos (ROOH e ROOA), (R1=COOH e R2=OCOOH) (adaptado de Ou *et al.*, 2001 e Prior *et al.*, 2005).

Para a realização do ensaio ORAC seguiu-se o método descrito por Ou e colaboradores (2001) com algumas modificações, tendo todas as determinações sido efectuadas em triplicado. As misturas reaccionais compostas por 20 µL das diferentes amostras diluídas em tampão fosfatos (75 mM, pH 7,4), 20 µL de diluições de trolox (entre 0,781 e 50 µM em tampão fosfatos 75 mM, pH 7,4) ou, no caso do branco, 20 µL de tampão fosfatos (75 mM, pH 7,4) e 160 µL de fluoresceína (0,075 µM em tampão fosfatos 75 mM, pH 7,4) foram preparadas em microplacas de 96 poços. Após as placas terem sido pré-incubadas durante cinco minutos a 37°C, iniciou-se a reacção com a adição a cada poço de 20 µL de uma solução de AAPH (35,7 g/L em tampão fosfatos 75 mM, pH 7,4) pré-aquecida a 37 °C. As placas foram colocadas num leitor de microplacas (Anthos Zenyth 3100) e incubadas a 37 °C, com agitação durante 30 minutos, tendo a fluorescência (λ de excitação = 485 nm e λ de emissão = 535 nm) sido medida em intervalos de 1 minuto.

A área sob a curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo foi calculada recorrendo à expressão (Ou *et al.*, 2001):

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_{30}/f_0$$

Em que f_0 representa a fluorescência inicial (tempo zero) e f_i a fluorescência ao minuto i .

A actividade antioxidante, expressa em mmol de equivalentes de trolox/L de amostra, foi quantificada por interpolação de uma recta de regressão linear entre os valores das concentrações de trolox e a área sob a curva de decaimento da fluoresceína obtida com as diversas concentrações de trolox testadas, após a subtracção da área obtida no ensaio em branco.

3.7 Avaliação da actividade mutagénica e antimutagénica através do teste de Ames

A identificação de substâncias capazes de induzir mutações tornou-se num importante procedimento na avaliação da segurança dos compostos químicos dada a estrita correlação que se verifica entre mutagenicidade e cancerogenicidade. As mutações no DNA podem ocorrer como mutações pontuais, onde apenas uma base é modificada, através da inserção ou deleção de uma ou várias bases e ainda como grandes deleções ou rearranjos do DNA, quebra ou rearranjo de cromossomas e finalmente através de ganho ou perda de cromossomas inteiros (Mortelmans & Zeiger, 2000).

O teste de Ames é um dos testes de curto termo mais utilizado em áreas de toxicologia genética para a detecção de substâncias ou compostos capazes de produzir danos genéticos e deste modo conduzir ao aparecimento de mutações. Este ensaio utiliza estirpes de *Salmonella typhimurium* LT-2, com mutações nos genes envolvidos na biossíntese de histidina, tornando-

as, assim incapazes de sintetizar este aminoácido (auxotróficos para a histidina (*his*⁻)) e portanto incapazes de crescer e formar colónias na sua ausência. A existência de estirpes contendo diferentes tipos de mutação no operão histidina permite detectar mutagénicos com diferentes mecanismos de acção em relação ao DNA. Deste modo, estirpes detentoras de mutações por substituição são mais sensíveis a mutagénicos que causem este tipo de mutação, enquanto que estirpes que possuam mutações por desfasamento são mais sensíveis a mutagénicos que originem deleções ou inserções de pares de bases na cadeia de DNA (Mortelmans & Zeiger, 2000). Quando a substância testada e/ou seus metabolitos interagem com o DNA bacteriano, pode ocorrer a reversão da mutação pré-existente. Esta reversão permite que a bactéria recupere a capacidade de sintetizar histidina e passe a conseguir crescer em meio de cultura não suplementado com este aminoácido (Maron & Ames, 1983).

O teste de Ames consiste em plaquear em meio mínimo, contendo uma quantidade mínima e limitante de histidina, uma quantidade fixa de bactérias (10^8 células) com quantidades variáveis do composto a testar. Esta quantidade limitante de histidina permite que as bactérias se dividam, apenas um número limitado de vezes, de modo a que as lesões que tenham ocorrido no DNA possam ser fixadas em mutações. Estas divisões originam o aparecimento na placa de uma turvação característica e visível a olho nu, que pode funcionar como um indicador de citotoxicidade, visto que a sua ausência indica que o composto em estudo causou morte celular generalizada. Após a exaustão da histidina do meio, apenas as bactérias que conseguiram reverter a mutação, ou seja as bactérias que passaram de *his*⁻ para *his*⁺, conseguem continuar a crescer formando colónias isoladas.

Um composto é considerado positivo no teste de Ames quando se obtém um efeito consistente de dose-resposta, isto é, quando se observa um aumento do número de revertentes com o aumento da concentração e, simultaneamente, quando para uma das doses estudadas se observa uma duplicação do número de revertentes espontâneos (número característico de cada estirpe que corresponde às bactérias que reverteram por si só a mutação inicial). A actividade mutagénica específica pode ser calculada pelo declive da parte linear da curva de dose-resposta.

Para além das mutações nos genes do operão responsável pela biossíntese da histidina, as estirpes utilizadas no teste de Ames também possuem mutações e alterações genéticas que lhes conferem maior sensibilidade e versatilidade na detecção de vários mutagénicos. A mutação de deleção ($\Delta uvrB$) no gene *uvrB* elimina o sistema enzimático de reparação do DNA por excisão, além de tornar a bactéria dependente da biotina, uma vez que esta mutação abrange também os genes envolvidos na biossíntese desta vitamina. A mutação *rfa* causa a diminuição parcial dos lipopolissacáridos do envelope bacteriano, o que se traduz por um aumento da permeabilidade celular a compostos de elevado peso molecular. A introdução do plasmídeo pKM101, que confere resistência à ampicilina, e que possui os genes de um sistema de

reparação errónea, conduz a um aumento da frequência de mutação e, consequentemente, a um aumento da sensibilidade das estirpes que o contêm (Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000).

3.7.1 Caracterização da estirpe utilizada

A estirpe de Ames utilizada no presente trabalho foi a estirpe TA102 cedida pelo Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa. Esta estirpe foi escolhida devido a ser bastante sensível na detecção de mutagénicos do tipo oxidativo, tais como o peróxido de hidrogénio, o cumeno-hidroperóxido, o tert-butil-hidroperóxido ou a bleomicina (Levin *et al.*, 1984).

Na estirpe TA102, e com o objectivo de ampliar o número de alvos por célula, o gene da histidina foi removido do cromossoma bacteriano encontrando-se o gene mutante (*hisG428*) no plasmídeo pAQ1, que confere resistência à tetraciclina. Para além desta mutação, esta estirpe possui ainda a mutação *rfa* e o plasmídeo pKM101. A estirpe TA102 difere das outras estirpes padrão utilizadas nos testes de Ames, pelo facto de possuir um par de base T:A (timina:adenina) no local de reversão, ao passo que todas as outras estirpes, possuem, neste local, o par de bases G:C (guanina-citosina). É provável que esta diferença seja responsável pela sensibilidade única da TA102 à reversão mediada por químicos oxidativos (Levin *et al.*, 1984). O facto de poder existir um número diferente de cópias do plasmídeo pAQ1 por célula leva à existência de alguma variação nos resultados obtidos com esta estirpe.

3.7.2 Realização do teste de Ames

Na avaliação da actividade mutagénica e antimutagénica das diferentes infusões estudadas, procedeu-se à realização do teste de Ames na variante de ensaio com pré-incubação conforme o descrito por Maron e Ames (1983). Foi preferida esta variante, pois ela permite aumentar a sensibilidade do teste, tendo em conta que as bactérias ficam expostas aos compostos em estudo durante algum tempo antes de efectuar a sua diluição na placa de Petri (Maron & Ames, 1983).

Todos os ensaios foram efectuados em triplicado. A estirpe TA102 foi inoculada em 5mL de meio NB, incubada durante 12 a 16 horas, a 37°C, com uma agitação de 210 rotações por minuto (rpm), ao abrigo da luz numa incubadora orbital, sendo mantida ao abrigo da luz e à temperatura de 4°C até à realização do ensaio.

Na realização dos ensaios de mutagenicidade os diferentes volumes, entre 0 e 140 µL das várias infusões analisadas, ou de diluições preparadas a partir delas, foram misturados com 500 µL de tampão de fosfatos de sódio (0,2 M, pH 7,4) e 100 µL da cultura bacteriana. De modo a

que o volume final em todas as misturas de pré-incubação fosse o mesmo, este foi sempre ajustado com água (solvente da amostra) até volumes finais 750 µL. As misturas assim preparadas foram incubadas a 37°C e 210 rpm, durante 20 minutos numa incubadora orbital. Terminada esta incubação adicionou-se a cada tubo 2 mL de gelose de superfícies (“top-agar”) (Tabela 3.2) fundida a 100°C e arrefecida até 45°C. Esta mistura foi então agitada e plaqueada em placas de Petri com meio VB (Tabela 3.3).

Tabela 3.2 - Composição da gelose de superfícies por litro (Maron & Ames, 1983).

Reagentes	Quantidade/Concentração
NaCl	5 g
Agar	6 g
Histidina	0,05 mM
Biotina	0,05 mM

Na preparação da gelose de superfície a histidina e a biotina são adicionadas após esterilização da mistura de NaCl e agar, a partir de uma solução estéril e equimolar de histidina e de biotina (0,5 mM). Após esta suplementação a gelose de superfície é imediatamente distribuída, em aliquotas de 2 mL, por tubos de vidro esterilizados.

Tabela 3.3 - Composição do meio VB (por litro) (Maron & Ames, 1983).

Reagentes	Quantidade (g)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Ácido cítrico monohidratado	2
K ₂ HPO ₄	10
NaH ₂ NH ₄ PO ₄ .4H ₂ O	3,5
Glucose	20
Agar	15

O meio VB resulta da mistura, após esterilização, de soluções de agar (1,5%), glucose (40%) e de uma solução de sais composta por MgSO₄.7H₂O (10g/L), ácido cítrico monohidratado (100g/L), K₂HPO₄ (500g/L) e NaH₂NH₄PO₄.4H₂O (175g/L).

As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 48 horas, procedendo-se então à contagem manual das colónias de revertentes *his*⁺ para cada concentração.

Nos ensaios de actividade antimutagénica, procedeu-se da mesma forma descrita para os ensaios de mutagenicidade, com a diferença que as misturas de pré-incubação continham, simultaneamente, um volume fixo (10µL) de uma solução de t-BHP (2,5µg/µL), preparada de

fresco por diluição em água estéril da respectiva solução comercial. Esta quantidade corresponde a uma concentração final de 0,28μmol de t-BHP/placa.

A actividade antimutagénica, expressa em percentagem de inibição da mutagenicidade, foi calculada através da seguinte expressão (Yen & Chen, 1995):

$$\% \text{Inibição} = [(RI-RE)-(RIM-RE)] \times 100 / (RI-RE)$$

Sendo RI o número de revertentes induzidos pelo mutagénico, RE o número de revertentes espontâneos e RIM o número de revertentes induzidos pelo mutagénico na presença da infusão em estudo.

3.8 Análise estatística dos dados

O tratamento estatístico dos dados foi efectuado recorrendo à utilização do “software” Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Washington).

4. Resultados e Discussão

4.1 Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteu

Através do método Folin-Ciocalteu, foram determinados os compostos fenólicos totais, expressos em mg equivalentes de ácido gálico por Litro de infusão. A Figura 4.1 apresenta a curva de calibração com ácido gálico, utilizada na determinação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras testadas. Neste ensaio utilizaram amostras preparadas de acordo com os dois métodos referidos no ponto 3.3.

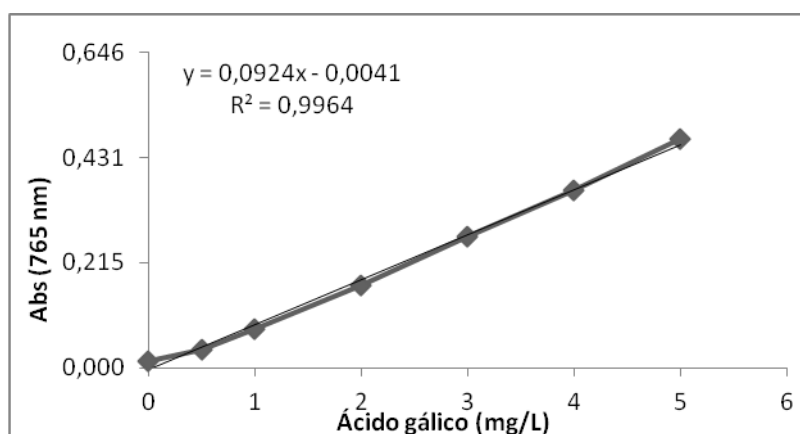


Figura 4.1- Recta de calibração com ácido gálico.

Tabela 4.1- Compostos fenólicos totais obtidos através de dois métodos.

Compostos fenólicos totais (mg eq ác.gálico/L)		
Amostras	Método 1	Método 2
Barbas de Milho	573 ^{a1} ± 16	797 ^{a2} ± 16
Carqueja	1435 ^{b1} ± 10	2196 ^{b2} ± 107
Dente de Leão	816 ^{c1} ± 19	1741 ^{c2} ± 34
Folhas de Oliveira	197 ^{d1} ± 5	391 ^{d2} ± 7
Urtiga-branca	593 ^{a1} ± 57	1454 ^{e2} ± 25

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05)

A composição em compostos fenólicos das infusões medicinais, preparadas de acordo com os dois métodos descritos anteriormente, é apresentada na tabela 4.1. Através da análise da mesma verifica-se uma variação significativa no teor em compostos fenólicos, quer entre as infusões das várias plantas, quer entre os dois métodos de preparação.

No primeiro método os valores variaram entre os 197 e os 1435 mg de equivalentes de ácido gálico/L, tendo a oliveira ocupado a última posição (em termos do conteúdo em fenóis totais), seguindo-se (numa ordem crescente) as barbas de milho, a urtiga-branca, o dente de leão

e, por fim, a carqueja. Exceptuando as amostras de barbas de milho e de urtiga-branca, que apresentaram valores semelhantes de acordo com o teste t ($p>0,05$), todos os outros valores foram significativamente diferentes.

Já no segundo método os valores variaram entre os 391 e os 2196 mg de equivalentes de ácido gálico/L, tendo a oliveira ocupado de novo a última posição e os outros seguido a mesma ordem, embora com valores mais elevados e todos significativamente diferentes ($p<0,05$).

Segundo Coelho e colaboradores (2011), a infusão da carqueja possui elevados teores polifenóis, tendo o valor registado neste estudo (2196 mg de equivalentes de ácido gálico/L) corroborado esta citação.

Comparando o teor em fenóis totais obtidos em ambos os métodos utilizados na preparação das infusões, verifica-se que o método 2 apresenta maior eficiência na extracção dos compostos fenólicos, uma vez que o teor dos mesmos foi sempre significativamente mais elevado que no método 1. Segundo vários estudos, o modo de preparação das infusões pode influenciar na extracção de compostos bioactivos, como os polifenóis, afectando assim as características antioxidantes das mesmas (Su *et al.*, 2006 e 2007; Komes *et al* 2010). Deste modo, pode verificar-se que existe uma correlação positiva entre o tempo e a temperatura de preparação da infusão com a eficiência de extracção dos compostos fenólicos, ou seja quanto maior o tempo em que a amostra fica exposta a uma temperatura elevada maior é a extracção de compostos bioactivos. No entanto, segundo Su e colaboradores (2007) condições de extracção com tempos longos e temperaturas elevadas (100°C durante 10 minutos), podem conduzir à perda de polifenóis, sendo as condições ideais de preparação das infusões, 100°C durante 3 minutos.

Devido aos resultados obtidos, foram as amostras obtidas através do método 2 as utilizadas nos restantes ensaios.

4.1 Quantificação dos Flavonóides Totais

A determinação dos flavonóides totais, expressos em mg equivalentes de quercetina por Litro de infusão, foi feita através do método de complexação com o alumínio. A Figura 4.2 apresenta a recta de calibração de quercetina, utilizada na quantificação dos flavonóides totais das infusões em estudo, encontrando-se os resultados obtidos para as diferentes amostras na Tabela 4.2.

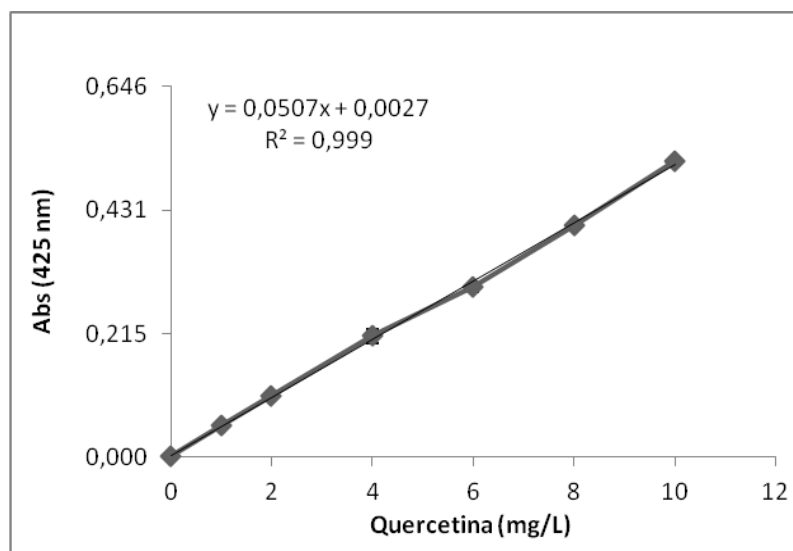


Figura 4.2- Recta de calibração de quercetina utilizada na determinação dos flavonóides totais.

Tabela 4.2- Teor em flavonóides totais nas amostras testadas

Amostras	Flavonóides totais (mg eq quercetina/L)
Barbas de Milho	9 ^a ± 0,8
Carqueja	79 ^b ± 0,56
Dente de Leão	13 ^c ± 0,28
Folhas de Oliveira	16 ^c ± 0,7
Urtiga-branca	78 ^b ± 0,93

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$)

Em relação à composição em flavonóides (Tabela 4.2) foi possível identificar três categorias de infusões. A categoria com teor mais elevado onde se encontram as infusões de carqueja e de urtiga-branca, com teores semelhantes segundo o teste t ($p > 0,05$), uma categoria intermédia onde se encontram as infusões de folhas de oliveira e dente de leão, com teores semelhantes segundo o teste t ($p > 0,05$) e, por último, a infusão de barbas de milho, que apresentou um teor em flavonóides significativamente inferior a todas as outras amostras.

Comparando o teor em flavonóides (Tabela 4.2) com o teor em fenóis totais (Tabela 4.1), verifica-se uma consistência em relação aos resultados dos valores encontrados para as infusões de carqueja e urtiga-branca, ou seja, estas infusões apresentaram valores elevados em ambos os ensaios. Em relação às restantes três infusões, verifica-se que a infusão de folhas de oliveira, apesar de ter apresentado o teor mais baixo em fenóis totais, apresentou um teor em flavonóides mais elevado do que as infusões de dente de leão e de barbas de milho. Este facto, parece

indicar, que os flavonóides contribuem mais para o total de fenóis da infusão de folhas de oliveira do que para o mesmo total das infusões de dente de leão e barbas de milho. Esta comparação aponta, assim, no sentido da existência, nos chás de barbas de milho e de dente de leão, de outros compostos fenólicos, como, por exemplo, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas, ou mesmo outros flavonóides, como as flavanonas ou os flavanóis, que embora sendo flavonóides formam com o alumínio complexos que absorvem a comprimentos de onda mais baixos (310-320 nm), não contribuindo, por isso, para a absorvância a 425 nm (Popova *et al.*, 2004). Em relação ao dente de leão os resultados obtidos estão de acordo com o publicado por Shutz e colaboradores (2006), que afirmam que os compostos fenólicos mais abundantes nas infusões desta planta são os ácidos fenólicos, em particular os ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados, como, por exemplo, o ácido clorogénico.

4.3 Determinação da actividade antioxidante das diferentes infusões medicinais

Para a caracterização da actividade antioxidante das diferentes infusões em estudo procedeu-se à avaliação da sua capacidade redutora com os ensaios FRAP e CUPRAC, à avaliação da sua capacidade de quelação de metais (capacidade de quelação do ferro (II)), e por fim à avaliação da sua capacidade de sequestro de espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente dos radicais anião superóxido, hidroxilo e peróxido (ensaio ORAC).

4.3.1 Determinação da actividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

Os valores FRAP das amostras testadas foram determinados por interpolação de uma recta de calibração realizada com sulfato ferroso (Figura 4.3), e encontram-se na Tabela 4.3.

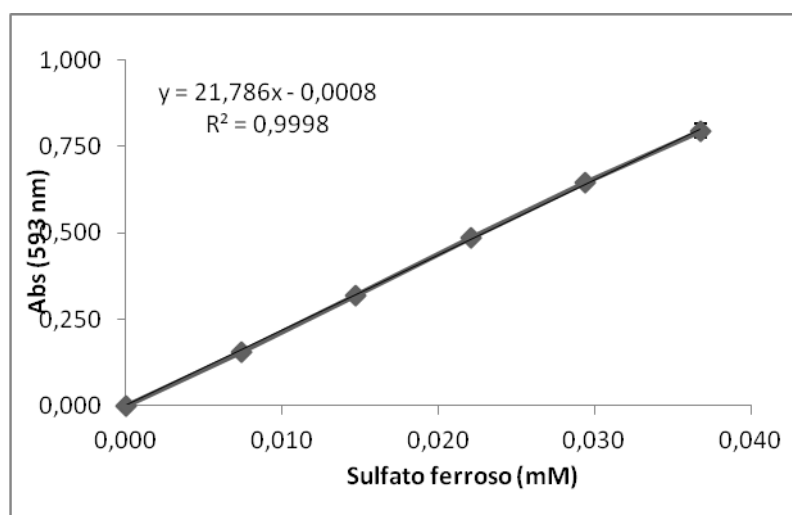


Figura 4.3- Recta de calibração de sulfato ferroso para o ensaio FRAP.

Tabela 4.3- Valores obtidos com as diferentes infusões no ensaio FRAP

Amostras	Valor de FRAP (mmol Fe ²⁺ /L de infusão)
Barbas de Milho	5,44 ^a ± 0,02
Carqueja	17,87 ^b ± 0,22
Dente de Leão	6,06 ^c ± 0,06
Folhas de Oliveira	3,38 ^d ± 0,04
Urtiga-branca	13,07 ^e ± 0,24

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05)

Através da análise da tabela 4.3 pode concluir-se que os valores das amostras para o ensaio FRAP são todos significativamente diferentes (teste t com p<0,05). Os valores variaram entre os 3,38 e os 17,9 mmol de Fe²⁺ por litro de infusão, sendo o menor valor pertencente à infusão de folhas de oliveira e o maior à de carqueja.

Comparando os valores obtidos para os fenóis totais (tabela 4.1) com os valores do FRAP (tabela 4.3) verifica-se que, com excepção da infusão de dente de leão e de urtiga-branca, que trocam de posição, a ordem seguida em termos de fenóis totais e valor FRAP é praticamente a mesma. Deste modo é possível perceber uma certa correlação positiva entre capacidade de redução do ferro medida pelo ensaio FRAP e o teor em fenóis totais. A comparação dos valores de FRAP com os valores obtidos para os flavonóides totais (tabela 3.2) parece também ter uma correlação positiva, embora haja também uma troca de posição das folhas de oliveira com o dente de leão.

Katalinic e colaboradores (2006) analisaram a actividade FRAP de infusões de 70 diferentes plantas medicinais tendo obtido valores entre 0,8 e 25 mmol Fe²⁺/L. Desta forma, os valores obtidos neste trabalho estão de acordo com os valores publicados na literatura para infusões de outras plantas medicinais. Segundo estes autores, os valores de FRAP podem dividir-se em cinco grupos: FRAP muito baixo (<1mM), FRAP baixo (1 a 5mM), FRAP bom (5 a 10mM), FRAP alto (10 a 20mM) e FRAP muito alto (>20mM). Assim, de acordo com esta classificação, a infusão de folhas de oliveira apresentou um valor de FRAP baixo, as de barbas de milho e dente de leão um valor de FRAP bom e as de carqueja e urtiga-branca valores de FRAP altos.

4.3.2 Determinação da redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC

Os valores CUPRAC das amostras testadas foram determinados por interpolação de uma recta de calibração realizada com ácido ascórbico (Figura 4.4.) e encontram-se apresentados na Tabela 4.4.

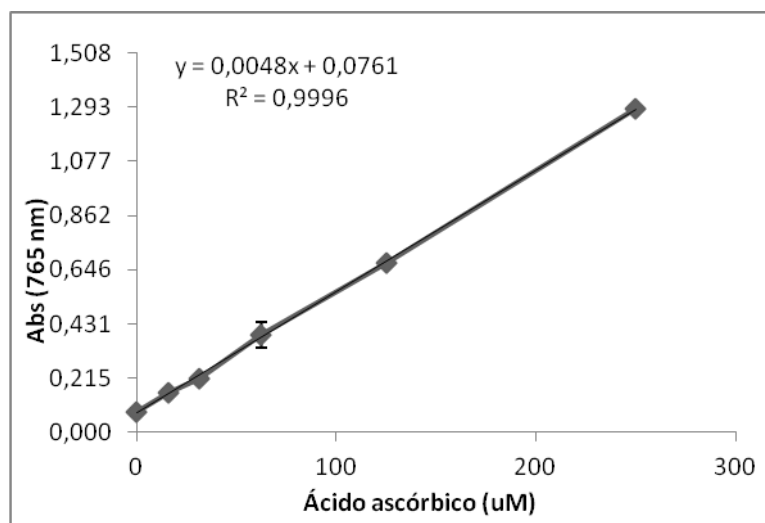


Figura 4.4 - Recta de calibração de ácido ascórbico para a realização do ensaio CUPRAC

Tabela 4.4-Valores obtidos com as diferentes amostras no ensaio CUPRAC

Amostras	Valor de CUPRAC (mmol ácido ascórbico/L de chá)
Barbas de Milho	4,7 ^a ± 0,1
Carqueja	19,6 ^b ± 0,2
Dente de Leão	8,8 ^c ± 0,2
Folhas de Oliveira	3,5 ^d ± 0,1
Urtiga-branca	12,2 ^e ± 0,2

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$)

Pela análise da tabela 4.4 pode verificar-se que os valores de CUPRAC de todas as amostras são significativamente diferentes (teste t com $p < 0,05$). Os valores variaram entre 3,5 mmol de ácido ascórbico/L para a infusão das folhas de oliveira e 19,6 mmol/L para a infusão da carqueja.

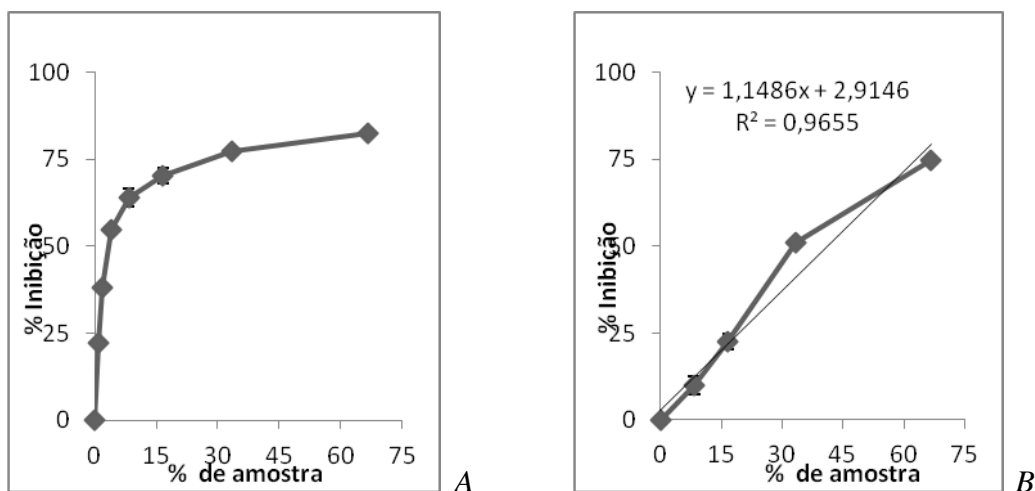
Sabendo que tanto o ensaio CUPRAC como o ensaio FRAP avaliam a actividade antioxidante das amostras pela sua capacidade de redução, era esperado obter valores concordantes entre estes dois ensaios. De facto, a observação dos valores obtidos nestes dois ensaios (Tabelas 4.3 e 4.4) mostra a existência de uma mesma linha de tendência, ou seja, os valores de CUPRAC seguiram a mesma ordem verificada no ensaio FRAP: folhas de oliveira < barbas de milho < urtiga branca < dente de leão < carqueja. Esta concordância de resultados aponta no sentido dos compostos responsáveis pelas actividades FRAP e CUPRAC serem maioritariamente os mesmos.

4.3.3 Determinação da capacidade de quelação de Fe (II)

O ensaio de avaliação da capacidade de quelação do Fe (II) demonstrou que todas as amostras apresentaram capacidade de quelação deste ião metálico, uma vez que, em relação ao controlo, se verificou uma diminuição da intensidade da cor, indicativa da formação dos complexos $[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4-}$, em função da percentagem da amostra. Assim, verificou-se a existência nas amostras de compostos capazes de inibir a formação dos complexos $[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4-}$, isto é de compostos capazes de quelar o Fe(II).

As curvas de percentagem de inibição da formação dos complexos Fe-ferrozina em função da percentagem de amostra presente na mistura reaccional em que se verificou essa inibição (Figura 4.5), permitiram calcular os valores de percentagem de amostra na mistura reaccional que levaram a 50% de inibição da formação dos complexos Fe-ferrozina, ou seja, o valor de IC_{50} (Tabela 4.5).

O facto das curvas de dose-resposta terem apresentado perfis distintos pode ser o resultado da diferente composição das amostras, ou seja, o resultado dos compostos responsáveis pela quelação deste ião metálico serem diferentes nas várias amostras. Deste modo, pode verificar-se que para as doses testadas, as curvas dose-resposta das infusões de barbas de milho e dente de leão entraram em patamar a cerca de 70% de inibição, enquanto que as curvas dose-resposta das infusões de carqueja e urtiga-branca nunca chegam a entrar em patamar com as doses testadas. Em relação à infusão de folhas de oliveira embora se tenha registado alguma inibição na formação dos complexos Fe-ferrozina, esta nunca chegou aos 50% pelo que não foi possível calcular o valor de IC_{50} .



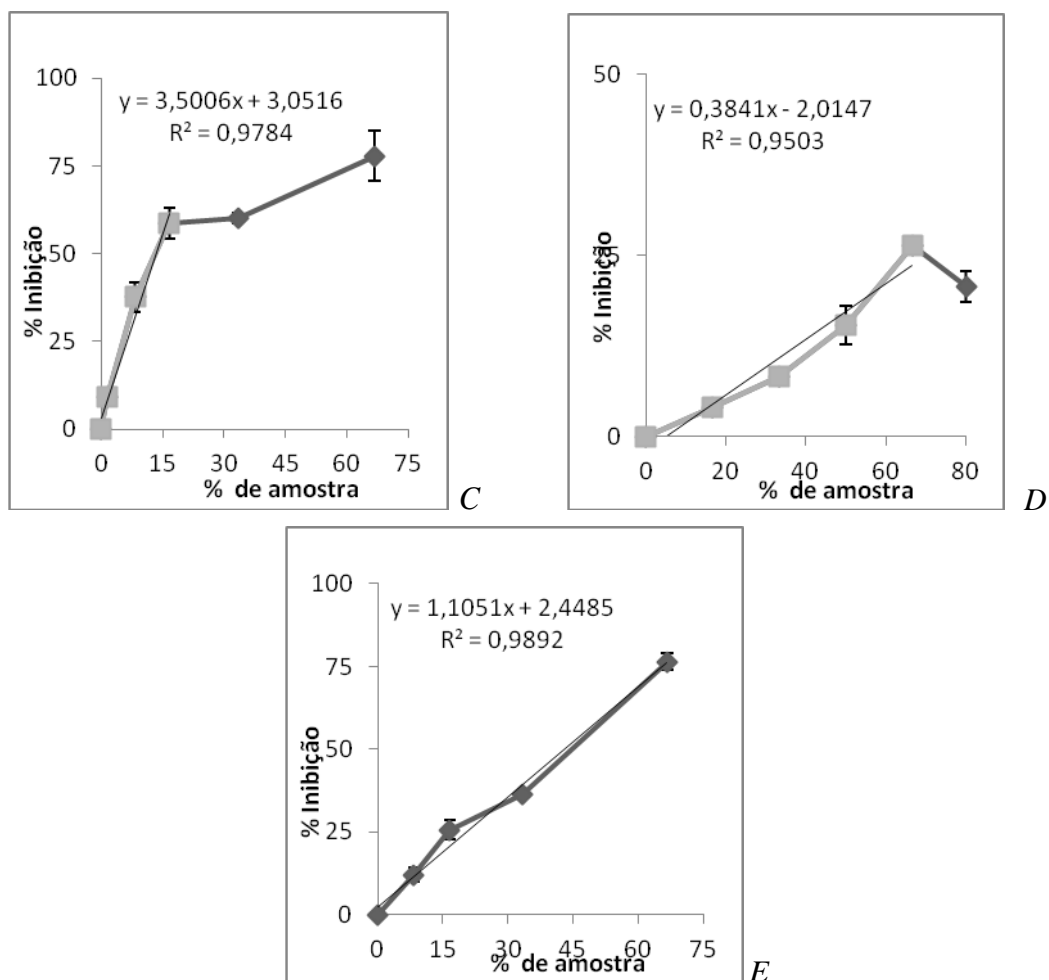


Figura 4.5- Curvas de dose-resposta para a inibição da formação de complexos $[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4-}$ (capacidade de quelatação de $\text{Fe}(\text{II})$) das infusões de (A) barbas de milho, (B) carqueja, (C) dente de leão, (D) folhas de oliveira e (E) urtiga-branca

Tabela 4.5 Valores de IC_{50} (% de amostra) das diferentes amostras no ensaio de quelatação do $\text{Fe}(\text{II})$

Amostras	IC_{50} (% de amostra)
Barbas de Milho	$3,7^{\text{a}} \pm 1$
Carqueja	$42^{\text{b}} \pm 5$
Dente de Leão	$14^{\text{c}} \pm 1$
Folhas de oliveira	nd
Urtiga-branca	$43^{\text{b}} \pm 3$

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$)

A análise tabela 4.5 indica, que segundo o teste t ($p < 0,05$), os valores de IC_{50} para as amostras de carqueja e urtiga-branca são semelhantes ($p > 0,05$), sendo significativamente diferentes para todas as restantes infusões. O IC_{50} variou assim entre 3,7 e cerca de 43%,

pertencendo o menor valor, que indica uma mais forte capacidade de quelação do Fe(II), à infusão de barbas de milho e o maior às infusões de carqueja e urtiga-branca.

Apesar das infusões de carqueja e a urtiga-branca terem apresentado os resultados mais significativos em relação aos ensaios anteriores (FRAP (Tabela 4.3) e CUPRAC (Tabela 4.4)), foram as que apresentaram menor capacidade de quelação do ferro. No entanto, embora tenha apresentado, em relação às duas infusões anteriores, um menor teor em fenóis (Tabela 4.1) e em flavonóides totais (Tabela 4.2), bem como de FRAP (Tabela 4.3) e CUPRAC (Tabela 4.4), a infusão de barbas de milho foi a que apresentou maior capacidade de quelação do ferro. Este facto aponta no sentido dos compostos responsáveis pelas actividades FRAP e CUPRAC e pela quelação de Fe(II) não serem exactamente os mesmos, parecendo os compostos fenólicos e, em particular, os flavonóides, estar mais envolvidos na actividade redutora do que na de quelação.

Também os resultados obtidos com a infusão de folhas de oliveira apontam no sentido do fraco envolvimento dos flavonóides na actividade de quelação do Fe(II). Isto porque, esta infusão apresentou um teor em flavonóides que foi aproximadamente o dobro do apresentado pela infusão de barbas de milho, tendo sido aquela que apresentou menor capacidade de quelação, não tendo mesmo sido possível determinar o seu valor de IC₅₀. No entanto, para se conseguir chegar a conclusões mais precisas seria necessário conhecer o perfil em flavonóides de cada uma destas duas infusões. Com efeito, a capacidade de quelação de ferro não é igual em todos os flavonóides (Galleano *et al.*, 2010) e, portanto, as diferenças verificadas, podem, igualmente, ser devidas a uma melhor eficiência de quelação do Fe(II) por parte dos flavonóides presentes na infusão de barbas de milho em relação aos flavonóides presentes na infusão de folhas de oliveira.

4.3.4 Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detectada pela diminuição da formação de formazano

Através da análise da Figura 4.6 percebe-se que todas as amostras apresentam capacidade de sequestrar o radical anião superóxido, uma vez que, em relação ao controlo, todas as amostras conduziram a uma diminuição da velocidade de formação do formazano, resultante da redução do NBT²⁺ pelo radical anião superóxido. Esta diminuição demonstra que as amostras possuem compostos (antioxidantes), capazes de captar o radical anião superóxido gerado pelo sistema NADH/PMS, causando, deste modo, uma diminuição da extensão de redução da NBT²⁺, com uma consequente diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm. Esta actividade é particularmente importante uma vez que *in vivo* ocorre a formação desta espécie radicalar.

A diminuição da velocidade de redução do NBT²⁺ aumentou com o aumento da quantidade de amostra presente na mistura reaccional até se atingir um patamar de saturação. A

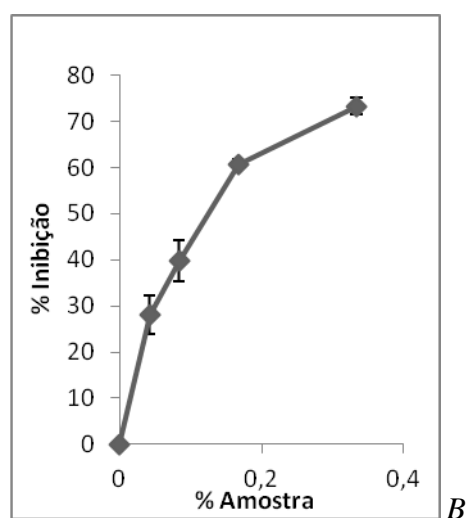
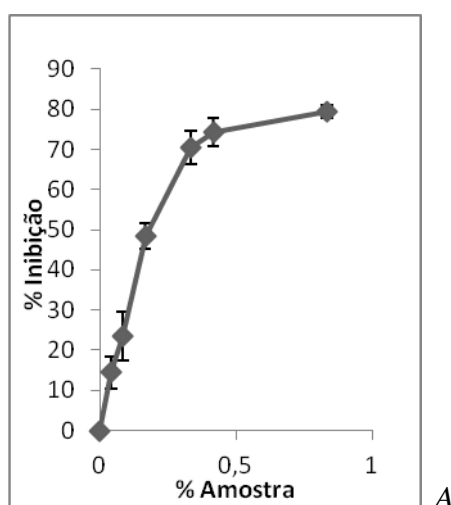
realização das curvas de percentagem de inibição da formação de formazano em função da percentagem de amostra presente na mistura de reacção, na qual se verificou essa percentagem de inibição (Figura 4.6), permitiu calcular a percentagem de amostra responsável por 50% de inibição da formação de formazano, ou seja, o IC₅₀ para as diferentes amostras (Tabela 4.6).

Tabela 4.6- Valores de IC₅₀ (% de amostra) das diferentes amostras de infusões de ervas para a actividade de sequestro do radical anião superóxido

Amostras	IC ₅₀ (% de amostra)
Barbas de Milho	0,239 ^a ± 0,011
Carqueja	0,125 ^b ± 0,005
Dente de Leão	0,089 ^c ± 0,009
Folhas de Oliveira	0,928 ^d ± 0,036
Urtiga-branca	0,174 ^e ± 0,007

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05)

De acordo com o teste t (p<0,05), os valores de IC₅₀ de todas as amostras diferiram de forma significativa. A infusão de dente de leão apresentou o menor valor de IC₅₀, ou seja, a maior capacidade de sequestro do radical anião superóxido, uma vez que conseguiu uma maior taxa de inibição com uma menor percentagem de amostra. As infusões de carqueja e de urtiga-branca também apresentaram uma boa capacidade de sequestro. Mais uma vez, o chá de folhas de oliveira foi o que apresentou uma actividade antioxidante mais baixa, uma vez que foi o que apresentou o valor de IC₅₀ mais elevado, significando por isso que é necessária uma maior quantidade desta amostra para se atingir os 50% inibição.



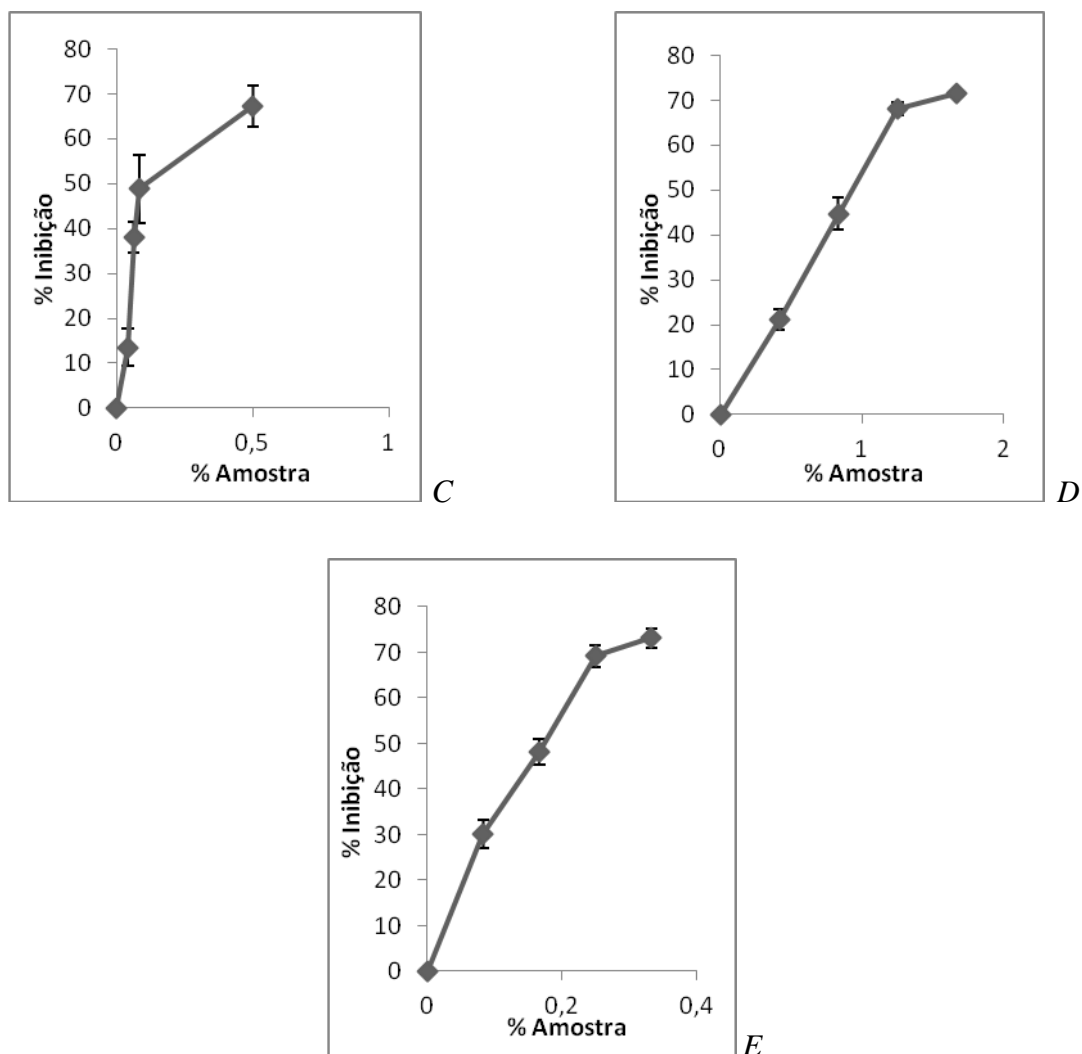


Figura 4.6- Efeito das infusões de (A) barbas de milho, (B) carqueja, (C) dente de leão, (D) folhas de oliveira e (E) urtiga-branca sobre a redução do NBT induzida pelo radical anião superóxido gerado no sistema NADH/PMS

4.3.5 Determinação da capacidade de sequestro do radical hidroxilo através do ensaio de degradação da desoxirribose

Através da análise da Tabela 4.7 verifica-se que todas as amostras foram capazes de inibir a degradação da desoxirribose, ou seja, todas as amostras demonstraram possuir compostos capazes de sequestrar o radical hidroxilo, diminuindo a extensão da degradação deste açúcar. Esta diminuição da extensão da degradação da desoxirribose resultou na diminuição da absorvância a 532 nm, fruto de uma diminuição da formação de compostos reactivos face ao TBA.

A comparação da absorvância a 532 nm na presença e na ausência (controlo) das amostras, permitiu calcular a percentagem de inibição da degradação da desoxirribose exercida por cada amostra numa concentração de cerca de 10% (volume/volume) na mistura reaccional (Tabela 4.7).

Tabela 4.7- Percentagem de inibição da degradação da desoxirribose em presença das diferentes amostras.

Amostras	% Inibição
Barbas de Milho	65 ^a ±0,6
Carqueja	68 ^b ±0,6
Dente de Leão	58 ^c ±0,9
Folhas de Oliveira	14 ^d ±0,6
Urtiga-branca	21 ^e ±0,9

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05)

Os valores obtidos neste ensaio foram todos significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05), sendo os valores mais elevados correspondentes aos chás de carqueja (68%) e de barbas de milho (65%), verificando-se o menor valor com o chá de folhas de oliveira, com uma percentagem de inibição de apenas 14%. De acordo com estes resultados, não é possível visualizar uma clara correlação entre estes valores e os valores obtidos pelos outros ensaios.

4.3.Determinação da capacidade de sequestro do radical peroxilo detectada pelo ensaio ORAC

A análise da tabela 4.8 mostra que todas as amostras apresentam capacidade de inibir oxidação da fluoresceína induzida pelo radical peroxilo, ou seja, em todas as amostras existem compostos capazes de doar um átomo de hidrogénio ao radical promovendo a sua desactivação.

Tabela 4.8- Valores obtidos com as diferentes infusões de ervas no ensaio ORAC.

Amostras	ORAC (mmol eq trolox/L de infusão)
Barbas de Milho	7 ^a ± 2
Carqueja	16 ^b ± 3
Dente de Leão	9 ^c ± 2
Folhas de Oliveira	6 ^d ± 2
Urtiga-branca	12 ^e ± 1

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05)

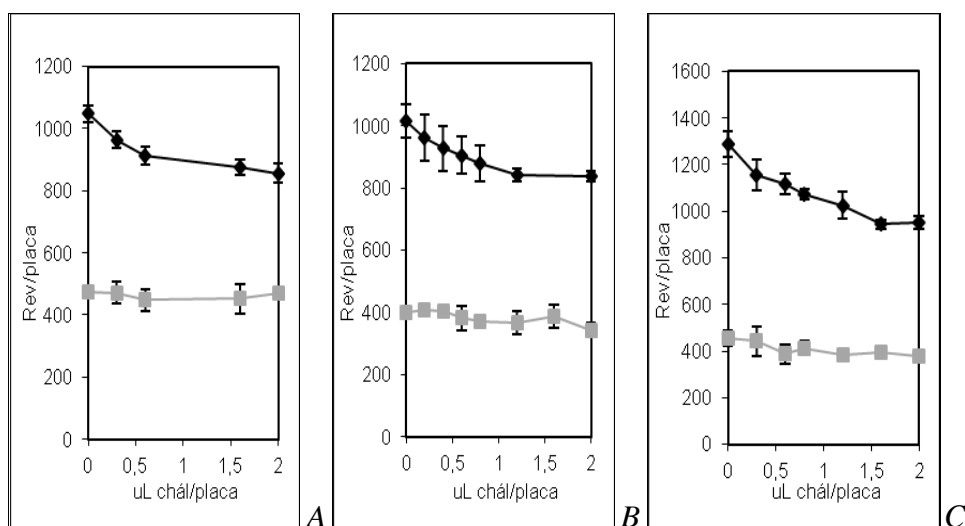
Os valores de ORAC obtidos variaram entre os 7, para as amostras de folhas de oliveira e barbas de milho, e 16 mmol eq trolox/L para a amostra de carqueja. Estes valores são relativamente semelhantes aos encontrados na literatura para este ensaio com outras amostras de chás de ervas. Poblete e colaboradores (2009) analisaram diferentes amostras de chá de ervas, tendo relatado valores entre 4,6 e 14,71 mmol de ácido gálico/L chá. Embora a unidade seja

diferente da utilizada no presente trabalho (mmol eq trolox/L) os autores constataram que a mudança da referência de ácido gálico para trolox não afectava os valores de ORAC (Poblete *et al.*, 2009).

Conforme já foi referido a infusão de carqueja foi a que apresentou uma capacidade de sequestro do radical peroxilo mais acentuada. Deste modo, e tendo em conta que os antioxidantes que normalmente conseguem desactivar este radical são designados de antioxidantes de quebra de cadeia, pode dizer-se que a infusão de carqueja possui uma elevada actividade de antioxidantes de quebra de cadeia. A urtiga-branca também apresentou uma boa capacidade de sequestro deste radical, tendo as outras infusões apresentados valores mais baixos. A falta de estudos parecidos em matrizes semelhantes não permite uma comparação mais exacta destes valores com os valores de outros estudos.

4.4 Avaliação da actividade mutagénica e antimutagénica através do teste de Ames

A avaliação da actividade antimutagénica das diferentes infusões medicinais foi feita através do teste da capacidade das amostras para reduzir a mutagenicidade do mutagénico oxidativo *tert*-butil-hidroperóxido (t-BHP), tendo este ensaio sido realizado na estirpe TA102, caracterizada pela sua grande sensibilidade a mutagénicos oxidativos (Levin *et al.*, 1984).



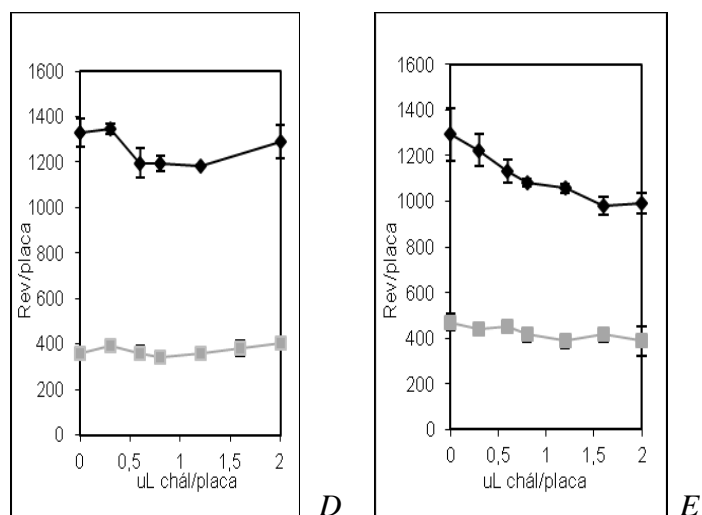


Figura 4.7- Curvas de dose-resposta das infusões de (A) barbas de milho, (B) carqueja, (C) dente de leão, (D) folhas de oliveira (E) urtiga branca na presença (—●—) e na ausência (—■—) de t-BHP, na estirpe TA102

A Figura 4.7 (A a E) apresenta as curvas dose-resposta das infusões barbas de milho, carqueja, dente de leão, folhas de oliveira e urtiga-branca na presença e na ausência do mutagénico t-BHP na estirpe TA102 de *Salmonella typhimurium*.

Conforme se pode verificar pela observação da Figura 4.7 (A a E), as amostras das diferentes infusões medicinais quando testadas sem o mutagénico t-BHP (curvas a cinzento) não apresentam mutagenicidade para a estirpe TA102, uma vez que não se verificou um aumento do número de revertentes em relação ao número de revertentes espontâneos em todas as doses testadas. A Figura 4.7 permite verificar que as amostras barbas de milho, carqueja, dente de leão e urtiga-branca causaram uma diminuição no número de revertentes induzidos pelo t-BHP e que essa diminuição foi consistente com o aumento da quantidade de amostra (curvas a preto nos gráficos A, B, C e E). Este comportamento indica que as amostras foram capazes de diminuir a actividade do mutagénico t-BHP. Deve salientar-se que o número de revertentes induzidos nunca atingiu valores inferiores ao número de revertentes espontâneos e que todas as amostras atingiram um patamar no final da curva dose-resposta. Deste modo, é possível concluir que a diminuição do número de revertentes por placa foi consequência da diminuição da actividade mutagénica do t-BHP e não de morte por toxicidade aguda provocada pelas amostras.

A infusão de folhas de oliveira não apresentou essa mesma capacidade de diminuir a actividade mutagénica do t-BHP, ou seja, não se verificou nenhuma diminuição do número de revertentes induzidos por este mutagénico com o aumento da quantidade de amostra (Figura 4.7 D).

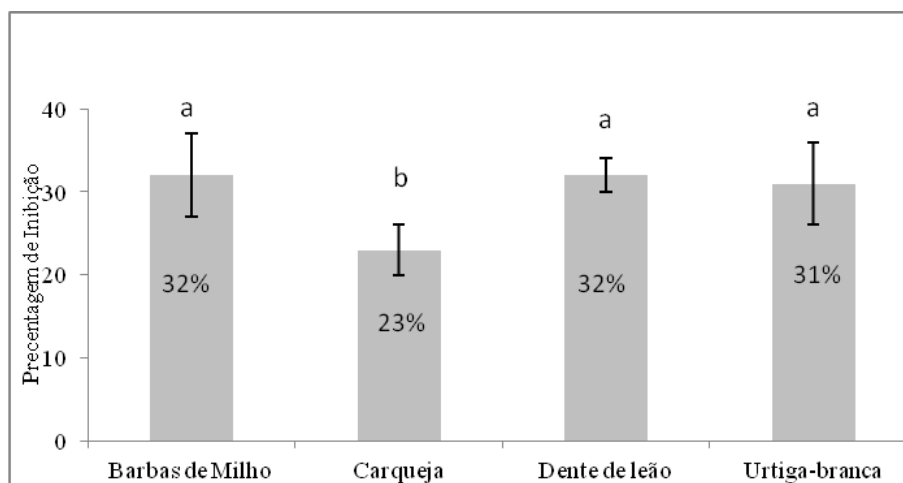


Figura 4.8- Percentagem máxima de inibição da mutagenicidade do t-BHP exercida pelas amostras das infusões barbas de milho, carqueja, dente de leão, folhas de oliveira e urtiga-branca. Amostras com letras diferentes significam percentagens de inibição significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0.05$).

O cálculo da percentagem de máxima de inibição da actividade do mutagénico t-BHP, obtida com as quatro infusões em que foi possível detectar actividade antimutagénica (Figura 4.8) mostrou que, estes valores foram relativamente semelhantes variando em torno dos 23% e 32% de inibição. A infusão da carqueja foi a que apresentou menor percentagem de inibição (23%), tendo as restantes apresentado valores semelhantes segundo o teste t ($p > 0,05$). Tendo em conta o teor em compostos fenólicos e a capacidade antioxidante da carqueja, o valor obtido para a actividade antimutagénica indica que a quantidade de compostos fenólicos não influencia grandemente a actividade antimutagénica podendo esta estar mais relacionada com o tipo de compostos fenólicos ou ainda com outros compostos presentes nas infusões das plantas medicinais.

4.5 Análise global dos resultados

Com o objectivo de tentar estabelecer relações entre a composição em compostos fenólicos e, em particular, em flavonóides, das amostras estudadas e as suas respectivas actividades antioxidantes e antimutagénicas efectuaram-se várias correlações lineares. Foram, por isso, determinadas as equações das rectas que melhor se ajustavam aos vários pontos experimentais obtidos e foi determinado o respectivo coeficiente de correlação linear de Pearson (r). Este coeficiente mede a intensidade da associação linear existente entre as variáveis e pode tomar valores entre -1 e 1 (Tabela 4.9).

Tabela 4. 9- Classificação da correlação em função do valor do coeficiente de correlação de Pearson (Santos, 2007)

Coeficiente de Pearson (r)	Tipo de correlação
$r = 1$	Perfeitamente positiva
$0,8 \leq r < 1$	Fortemente positiva
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderadamente positiva
$0,1 \leq r < 0,5$	Fracamente positiva
$0 < r < 0,1$	Infimamente positiva
$r = 0$	Nula
$-0,1 < r < 0$	Infimamente negativa
$-0,5 < r \leq -0,1$	Fracamente negativa
$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderadamente negativa
$-1 < r \leq -0,8$	Fortemente negativa
$r = -1$	Perfeitamente negativa

A Tabela 4.10 apresenta os valores do coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor em fenóis totais e o teor em flavonóides para as infusões de barbas de milho, carqueja, dente de leão, folhas de oliveira e urtiga-branca. O valor obtido ($r=0,633754$) indica a existência de uma correlação moderadamente positiva entre o teor em fenóis totais e o teor de flavonóides totais. Os resultados obtidos para os dois ensaios apontavam neste sentido, uma vez que a infusão de folhas de oliveira apesar de possuir um menor teor em fenóis totais que as infusões de barbas de milho e de dente de leão apresentou um teor em flavonóides totais mais elevado. Este facto parece indicar, que relativamente às infusões de barbas de milho ou de dente de leão, na infusão de folhas de oliveira os flavonóides representam uma maior fracção dos fenóis totais.

Tabela 4.10- Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição em fenóis totais e em flavonóides das cinco amostras estudadas

	Fenóis	Flavonóides^b
Fenóis^a	1	
Flavonóides^b	0,633754	1

a) mg eq ác.gálico/L de chá; b) mg eq. quercertina/L de chá

Na Tabela 4.11 apresentam-se os valores do coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor em fenóis e flavonóides totais e a actividade antioxidante (excepto a quelação do ferro) detectada pelos vários ensaios realizados para as amostras barbas de milho, carqueja, dente de leão, folhas de oliveira e urtiga-branca.

A análise da Tabela 4.11 mostra uma correlação fortemente positiva entre o teor em fenóis totais e a actividade antioxidante determinada nos ensaios FRAP e CUPRAC. De facto, as infusões com maior teor de fenóis totais foram as que apresentaram maiores valores de FRAP e CUPRAC, indicando que os polifenóis contribuem significativamente para a actividade antioxidante detectada por estes ensaios. Desta forma, os resultados obtidos suportam a hipótese

dos polifenóis estarem envolvidos nos mecanismos de actividade antioxidante por transferência electrónica. A existência de correlações fortemente positivas entre o teor em fenóis totais e os valores de FRAP foi, igualmente, verificada por outros autores, quer em outras amostras de chás de ervas (Katalinic *et al.*, 2006) quer em amostras de chá preto e verde (Benzie & Szeto, 1999).

A correlação entre os flavonóides totais e as actividades FRAP e CUPRAC foi, igualmente, fortemente positiva. Este facto parece indicar, que dos vários polifenóis presentes nas amostras, os flavonóides sejam os maioritariamente responsáveis pela actividade antioxidante detectada nestes dois ensaios. No entanto, este facto não se verifica com as folhas de oliveira que, apesar de apresentarem valores significativos de flavonóides foram das infusões com menores valores FRAP e CUPRAC. Como foi referido anteriormente, este facto pode estar relacionado com o tipo de flavonóides presentes. Com efeito os flavonóides parecem apresentar uma actividade antioxidante mais elevada quanto maior for o número de grupos hidroxilo que se encontram ligados ao anel aromático-B (Zeng & Wang, 2011).

Tabela 4.11- Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e actividade antioxidante das várias amostras sem o ensaio de quelação do ferro.

	Fenóis ^a	Flavonóides ^b	FRAP ^d	CUPRAC ^e	Sequestro hidroxilo ^f	Sequestro superóxido ^c	ORAC ^h
Fenóis ^a	1						
Flavonóides ^b	0,633754	1					
FRAP ^d	0,803585	0,93922	1				
CUPRAC ^e	0,904199	0,862666	0,970302	1			
Sequestro hidroxilo ^f	0,547927	-0,06495	0,273774	0,37242	1		
Sequestro superóxido ^c	-0,80018	-0,37686	-0,56048	-0,60065	-0,6813	1	
ORAC ^h	0,882568	0,895631	0,986076	0,996646	0,338122	-0,6023	1

a) mg eq. ác.gálico/L; b) mg eq. quercertina/L; c) IC₅₀ (% amostra); d) mmol Fe²⁺/L; e) mmol ácido ascórbico/L; f) % de inibição da degradação da desoxirribose; g) mmol eq. Trolox/L

Foi igualmente possível observar a existência de uma correlação fortemente positiva entre os ensaios FRAP e CUPRAC, o que sugere o envolvimento dos mesmos compostos em ambas as reduções.

A correlação dos fenóis totais com o sequestro de radicais livres apresenta-se como fortemente positiva para o sequestro do radical superóxido e para o radical peróxido (ensaio ORAC) e como moderadamente positiva para o sequestro do radical hidroxilo. Apesar da correlação com o superóxido teoricamente aparecer com valores negativos indicando uma correlação fortemente negativa, como este ensaio foi expresso em valores de IC₅₀ (percentagem de amostra), logo, quanto menor o valor, maior é capacidade de sequestro. Estes resultados apontam no sentido de um envolvimento dos fenóis em todas as actividades de sequestro analisadas. Da mesma forma, a correlação dos ensaios FRAP e CUPRAC foi também mais forte

com os ensaios ORAC e sequestro do radical anião superóxido do que com o sequestro do hidroxilo, o que seria de esperar dada a pior correlação que este ensaio apresentou com o teor em fenóis totais. A correlação do sequestro do radical anião superóxido com o do radical hidroxilo ou peróxido demonstrou ser moderadamente negativa, ou seja moderadamente positiva (devido ao que já foi explicado anteriormente), sendo a correlação entre o sequestro dos dois últimos fracamente positiva. O único dos ensaios de sequestro que se correlacionou de forma significativa com o teor em flavonóides foi o ensaio ORAC, o que aponta no sentido desta classe de polifenóis poder desempenhar um papel importante no sequestro do radical peróxido.

Apesar das diferenças encontradas no teor em fenóis e flavonóides totais e nos diversos ensaios de actividade as infusões de dente de leão, urtiga-branca e barbas de milho apresentaram idêntica actividade antimutagénica contra o t-BHP. Mais ainda, apesar de ter sido a infusão que mais se destacou pelo seu teor em fenóis totais e uma das que mais se destacou nos ensaios de redução e de sequestro, a infusão apresentou uma actividade antimutagénica inferior à das infusões anteriormente referidas. Assim, os resultados obtidos apontam no sentido de estarem envolvidos além dos compostos fenólicos outro tipo de compostos na inibição da actividade mutagénica do t-BHP.

Na Tabela 4.12 apresentam-se os valores do coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor em fenóis e flavonóides totais, actividades FRAP, CUPRAC e de sequestro e a capacidade de quelação de Fe(II). Estes dados estão apresentado à parte uma vez que, para a construção desta tabela, não foram incluídos os valores respeitantes à infusão de folhas de oliveira por não se ter conseguido determinar o seu IC₅₀ para a quelação de Fe(II).

Tabela 4.12 - Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e actividade antioxidante das amostras barbas de milho, carqueja, dente de leão e urtiga-branca

	Quelação de Fe(II) IC₅₀ (% amostra)
Fenóis (mg eq. ác.gálico/L)	0,664127
Flavonóides (mg eq. quercertina/L)	0,984797
Quelação de Fe(II) IC₅₀ (% amostra)	1
FRAP (mmol Fe²⁺/L)	0,923852
CUPRAC (mmol ácido ascórbico/L)	0,864194
Sequestro do hidroxilo (% de inibição)	-0,48707
Sequestro do superóxido IC₅₀ (% amostra)	-0,31947
ORAC (mmol eq. Trolox/L)	0,900001

Pela análise da Tabela 4.12 pode verificar-se que, uma vez que a capacidade de quelação de ferro se encontra expressa em IC_{50} , o ensaio de quelação de ferro não se correlacionou nem com o teor em fenóis totais, nem com o teor em flavonóides nem ainda com os ensaios de actividade antioxidante que melhor se correlacionaram com estes dois parâmetros, ou seja, os ensaios FRAP, CUPRAC e ORAC. O que parece indicar que não sejam os compostos fenólicos, nem em particular os flavonóides, os compostos que mais contribuem para esta actividade.

A análise de correlações que se efectuou pretende apenas sugerir possíveis associações entre as classes de compostos presentes nas infusões e as actividades antioxidantes detectadas. Contudo, esta análise baseada unicamente em ferramentas estatísticas apresenta diversas limitações. Assim, as propriedades antioxidantes dos compostos isolados dentro de um grupo podem variar consideravelmente de modo que os mesmos níveis de compostos fenólicos não correspondam necessariamente às mesmas respostas antioxidantes. Mais ainda, o facto das infusões serem misturas complexas, com múltiplos compostos diferentes, faz com que possam co-existir compostos com actividades opostas, por exemplo, compostos com actividade antioxidante juntamente com compostos com actividade pró-oxidante, ou ainda que possam ocorrer fenómenos de sinergia e/ou potenciação entre os vários compostos, que acabam por, de alguma forma, “mascarar” os resultados obtidos na análise de correlação.

5. Conclusão

A popularidade das infusões de plantas medicinais tem vindo a aumentar ao longo dos tempos, em grande parte devido a serem caracterizadas como bebidas saudáveis, ricas em compostos bioactivos e, por isso, consideradas poderosas aliadas no combate a vários tipos de afecções, embora muitos dos seus alegados efeitos na saúde careçam ainda de uma confirmação científica. Deste modo, vários trabalhos têm vindo a ser desenvolvidos com o objectivo de confirmar as propriedades relacionadas com a promoção da saúde que estas infusões podem apresentar, propriedades essas que incluem, entre outras, actividade antimicrobiana, antioxidante e antimutagénica.

O objectivo deste trabalho foi o de contribuir para um melhor conhecimento das propriedades bioactivas de cinco infusões de plantas medicinais de consumo comum em Portugal nomeadamente as infusões de carqueja, dente de leão, barbas de milho, folhas de oliveira e urtiga-branca. Para isso determinou-se o seu conteúdo em compostos fenólicos totais e em flavonóides totais, dada a associação que tem vindo a ser estabelecida entre a existência destes compostos e as propriedades benéficas para a saúde que exercem os alimentos de origem vegetal. Foi também objectivo deste trabalho estimar a capacidade antioxidante e antimutagénica destas infusões. Assim, a capacidade para inibir os efeitos mutagénicos do *tert*-butil hidroperóxido foi utilizada para avaliar a actividade antimutagénica, enquanto que para avaliar a actividade antioxidante foram utilizados diferentes tipos de ensaios com o objectivo cobrir vários dos mecanismos pelos quais esta actividade pode ser exercida. Foram então realizados ensaios de avaliação da actividade redutora (FRAP e CUPRAC), da capacidade de quelação de Fe(II) e de sequestro de três das mais importantes espécies reactivas de oxigénio passíveis de se formarem *in vivo*, nomeadamente, o radicais hidroxilo, anião superóxido e peróxido.

Os resultados mostraram que todas as infusões em estudo possuem capacidade antioxidante (detectada através dos ensaios de capacidade redutora e de sequestro de ROS), e, com excepção da infusão de folhas de oliveira, actividade antimutagénica. A infusão de carqueja foi a que apresentou maior teor em fenóis e flavonóides e a que mais se destacou na maioria dos ensaios de actividade antioxidante que envolvem capacidade redutora ou capacidade de sequestro de ROS, sugerindo o envolvimento destes compostos neste tipo de actividade antioxidante. Contudo, esta infusão apresentou uma menor actividade antimutagénica que as infusões de barbas de milho, dente de leão ou urtiga-branca, sugerindo, assim, que a actividade antimutagénica resulte da acção de outra, ou de outras, classes de compostos para além dos compostos fenólicos.

Verificou-se também que, com excepção da infusão de folhas de oliveira, todas as

infusões apresentaram actividade de quelação de Fe(II). Esta actividade é considerada igualmente um mecanismo antioxidante dada a possibilidade deste não originar radicais hidroxilo através das reacções de Fenton. A capacidade de quelação de Fe(II) parece estar associada a outros compostos diferentes dos fenóis, uma vez que a infusão de barbas de milho, uma das infusões com mais reduzido conteúdo em fenóis totais, foi a que mais se destacou nesta actividade.

Para se conseguir com melhor precisão estabelecer associações entre as actividades biológicas estudadas e os compostos que as originam, teria todo o interesse efectuar uma análise química mais detalhada das várias amostras estudadas. Assim, este estudo ficaria mais completo com a determinação do perfil em compostos fenólicos e com a identificação e quantificação de outros compostos, nomeadamente vitaminas. Desta forma seria possível estudar estes compostos isoladamente e realizar uma melhor identificação dos principais compostos bioactivos presentes nas várias infusões.

A maioria dos polifenóis também mostra actividade anti-microbiana. Alguns polifenóis do chá, como as catequinas, proantocianidinas e taninos hidrolisáveis, têm demonstrado possuir actividade anti-microbiana. A capacidade de tolerância das bactérias aos polifenóis depende da espécie bacteriana e da estrutura dos polifenóis em causa. Deste modo, alguns polifenóis apresentam capacidade de inibir o crescimento de bactéria do género *Clostridium*, assim como da *Helicobacter pylori*, mas não de algumas bactérias lácticas intestinais consideradas benéficas para o Homem (Almajano *et al*, 2008). Assim a avaliação da capacidade das várias infusões aqui estudadas, para inibir certos tipos de microrganismos pode ser encarada como um tema a ser desenvolvido.

A extrapolação destes resultados para a situação *in vivo* não pode ser imediata. Com efeito o facto de um composto apresentar uma determinada actividade *in vitro* não é condição necessária e suficiente para que a mantenha nas condições fisiológicas. Para que isso aconteça é necessário que ele resista ao processo de digestão gastro-intestinal, que seja absorvido pelas células do intestino e que não seja rapidamente inactivado nem pelas bactérias da flora intestinal, nem pelas enzimas de biotransformação humanas.

Assim a extrapolação para as condições *in vivo*, carece de estudos mais aprofundados sobre a biodisponibilidade dos compostos bioactivos destas infusões. A absorção digestiva dos polifenóis parece variar consoante a sua estrutura, o que faz com que nem sempre sejam os polifenóis mais abundantes nos alimentos aqueles que podem atingir maiores concentrações no interior das células humanas. O ácido gálico e as isoflavonas parecem ser os polifenóis mais bem absorvidos, seguidos pelas catequinas, flavanonas e glicosídeos de quercetina, sendo as proantocianidinas, as catequinas galato do chá e as antocianinas os polifenóis de mais difícil

absorção (Manach *et al.*, 2005). Sabe-se que o consumo do chá verde e preto são capazes de aumentar os polifenóis presentes no plasma, levando a um aumento da sua actividade antioxidante em cerca de 41 a 48% após consumo de cerca de 300 ml de chá (Vinson & Yousef, 1998). Desta forma, apesar de poderem ser absorvidos em pequena quantidade, essa pequena quantidade que é absorvida parece ser suficiente para exercer efeitos benéficos à saúde.

A metabolização pela flora intestinal tem sido pouco estudada mas pode ter um efeito preponderante nas actividades biológicas destes compostos, uma vez que os polifenóis que não forem absorvidos no tracto gastro-intestinal, podem ser metabolizados por estas bactérias, originando metabolitos passíveis de ser absorvidos no epitélio do cólon e, desta forma, chegar à corrente sanguínea. Por exemplo, as proantocianidinas têm demonstrado alguns efeitos em ensaios epidemiológicos embora se saiba que a sua absorção intestinal seja muito reduzida. Desta forma, é possível que os efeitos biológicos associados a estes compostos resultem de algum metabolito formado no decurso da sua metabolização pelas bactérias da flora intestinal (Williamson & Manach, 2005).

Desta forma a realização de ensaios sobre a resistência ao processo de digestão, sobre a possibilidade de absorção e sobre a biotransformação dos compostos bioactivos presentes nestas infusões, já seriam um importante contributo para possibilitar a extrapolação dos resultados aqui obtidos para a situação real *in vivo*.

6. Referências Bibliográficas

- Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, **18**(1), 75-81.
- Al-Gubory, K. H., Fowler, P. A., & Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **42**(10), 1634-1650.
- Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, **221**(4617), 1256-1264.
- Antunes, L., & Araújo, M. (2000). Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos Principais Corantes para Alimentos. *In*, **13** (2) 81-88
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(26), 7970-7981.
- Asres, K., Sporer, F., & Wink, M. (2004). Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**(10), 915-930.
- Belizário, J. E. (2002). O próximo desafio reverter o câncer. *Ciência Hoje*, **31**(184), 51-57.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., & Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, **68**(4), 457-462.
- Benzie, I. F. F., & Szeto, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**(2), 633-636.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, **239**(1), 70-76.
- Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**, 235-248.
- Bothast, J. R. & Schlicher, M. A. (2005). Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **67**:19-25
- Buonocore, G., Perrone, S., & Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, **15**(4), 186-190.
- Bylka, W., Matlawska, I. & Frański, R. (2010). Essential oil composition of *Taraxacum officinale*. *Acta Physiologiae Plantarum*, **32**:231-234.
- Coelho, M. T., Gonçalves, J. C., Alves, V., & Martins, M. M. (2011). Antioxidant activity and phenolic content of extracts from different *Pterospartum tridentatum* populations growing in Portugal. *Procedia Food Science*, **1**(0), 1454-1458.
- Chobot, V. (2010). Simultaneous Detection of Pro- and Antioxidative Effects in the Variants of the Deoxyribose Degradation Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(4), 2088-2094.
- Chung, F.-L., Chen, H.-J. C., & Nath, R. G. (1996). Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis*, **17**(10), 2105-2111.

- Cook, N. C., & Samman, S. (1996). Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **7**(2), 66-76.
- De Flora, S. (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **402**(1-2), 151-158.
- Dufresne, C. J., & Farnworth, E. R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **12**(7), 404-421.
- Dunlap, W., Llewellyn, L., Doyle, J., & Yamamoto, Y. (2003). A microtiter plate assay for screening antioxidant activity in extracts of marine organisms. *Marine Biotechnology*, **5**(3), 294-301.
- Espin, J. C., Garcia-Conesa, M. T., Francisco A., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, **68**, 2986–3008.
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, **475**, 89-111.
- Ferreira, I. C. F. R., & Abreu, R. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanalise*, **IV**(2), 32-39.
- Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Soares, M. E., Bastos, M. L., & Pereira, J. A. (2007). Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*, **103**(1), 188-195.
- Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2010). Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **501**(1), 23-30.
- Gaspar, J., Silva, I. D., Laires, A., Rodrigues, A., Costa, S. & Rueff, J. (1996). Prooxidant activities of flavonols: a structure activity study, in: Kumpulainen & Salonen (Eds.), *Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido, 290-297.
- Geckil, H., Ates, B., Durmaz, G., Erdogan, S., & Yilmaz, I. Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal Chelating Characteristics of Propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **1**(1), 27-31.
- Goldman, R., & Shields, P. G. (2003). Food Mutagens. *The Journal of Nutrition*, **133**(3), 965S-973S.
- Grosso, C. A., Costa, M. M., Ganço, L., Pereira, A. L., Teixeira, G., Lavado, J. M. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2007). Essential oil composition of *Pterospartum tridentatum* grown in Portugal. *Food Chemistry*, **102**(4), 1083-1088.
- Guinda, Á., Pérez-Camino, M. C., & Lanzón, A. (2004). Supplementation of oils with oleanolic acid from the olive leaf (*olea europaea*). *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**(1), 22-26.
- Gülçin, İ. (2011). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, DOI 10.1007/s00204-011-0774-2.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Alici, H. A., Elmastaş, M., & Büyükkuroğlu, M. E. (2004). In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, **49**(1), 59-66.

Halliwel, B. (1996). Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*, **16**(1), 33-50.

Halliwel, B., Aeschbach, R., Löliger, J., & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, **33**(7), 601-617.

Halliwel, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **57**(5), 715S-724S.

Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**(6), 481-504.

Hayes, J.E., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M.N., & Kerry, J.P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, , 948–955.

Hu, C., & Kitts, D. D. (2005). Dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extract suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide and prevents lipid oxidation in vitro. *Phytomedicine*, **12**(8), 588-597.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(6), 1841-1856.

Ji, L.-L., Chen, Y., & Wang, Z.-T. (2008). The toxic effect of pyrrolizidine alkaloid clivorine on the human embryonic kidney 293 cells and its primary mechanism. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **60**(1), 87-93.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, **94**(4), 550-557.

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, **30**(6), 620-650.

Komes, D., Horzic, D., Belscak, A., Ganic, K. K., & Vulic, I. (2010). Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Research International*, **43**(1), 167-176.

Koşar, M., Göger, F., & Can Başer, K. H. (2008). In Vitro Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**(7), 2369-2374.

Kris-Etherton, P. M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F. Griel, A. E., & Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, **113**(9B), 71S-88B.

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocess Processing*, **89**(3), 217-233.

Levin, D. E., Hollstein, M., Christman, M. F., Schwiers, E. A., & Ames, B. N. (1982). A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **79**(23), 7445-7449.

- Lianda, R. L. P. & Castro, R. N. (2008). Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. *Química Nova*, **31**(6), 1472-1475.
- Lima, A.R., Pereira, R.G.F.A., & Abrahão, S.A. (2010) Compostos bioativos do café: Actividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após descafeinação. *Química Nova*, **33**(1), 20-24.
- Liu, J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* **49**, 57-68.
- Liu, J., Wang, C., Wang, Z., Zhang, C., Lu, S. & Liu, J.(2011). The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chemistry*, **126**, 261–269.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **613**(1), 1-19.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81**(suppl), 230S-242S.
- Maksimović, Z., Malenčić, Đ., & Kovačević, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource Technology*, **96**(8), 873-877.
- Maron, D. M., & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, **113**(3-4), 173-215.
- Matkowski, A., & Piotrowska, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, **77**(5), 346-353.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, **85**(2), 231-237.
- Miller, E., & Miller, J. (1986). Carcinogens and mutagens that may occur in foods. *Cancer*, **58**(8), 1795-1803.
- Moraes, F. P., & Colla, L. M. (2006). Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **3**(2), 109-122.
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **455** (1-2), 29-60.
- Møller, P., & Wallin, H. (1998). Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **410**(3), 271-290.
- Nakamura, S., Kato, A., & Kobayashi, K. (1992). Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**(11), 2033-2037.
- Nuss, E. T. & Tanumihardjo, S. A. (2010). Maize: A Paramount Staple Crop in the Context of Global Nutrition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **9**, 417-436.

- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(10), 4619-4626.
- Paduch, R., Wójciak-Kosior, M. & Matysik, G. (2007). Investigation of biological activity of *Lamii albi flos* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **110**, 69–75.
- Parkinson, A. (1996). Biotransformation of xenobiotics. *in*: Klaassen, C.D., Amdur, M.O. & Doull, J. (Eds.) *Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons*. 5^a Edição, McGraw-Hill Companies, New-York, EUA, pp 113-186.
- Poblete, A., Lopez-Alarcon, C., Lissi, E., & Campos, A. M. (2009). Oxygen radical antioxidant capacity (orac) values of herbal teas obtained employing different methodologies can provide complementary data. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **54**(2), 154-157.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., & Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, **15**(4), 235-240.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(10), 4290-4302.
- Proença Da Cunha, A., Pereira Da Silva, A., & Rodrigues Roque, O. (2003). *Plantas E Produtos Vegetais Em Fitoterapia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Ramful, D., Baborun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., & Aruoma, O. I. (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, **278**(1), 75-87.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, **113**(3), 189-207.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**(7), 933-956.
- Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*, **22**(1), 19-34.
- Ryan, T. P. & Aust, S. D. (1992) The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Critical Reviews in Toxicology*, **22**(1), 119-141.
- Santos, C. (2007). *Estatística Descritiva - Manual de Auto-aprendizagem*. Lisboa.
- Schütz, K., Carle, R., & Schieber, A. (2006). Taraxacum--A review on its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of Ethnopharmacology*, **107**(3), 313-323.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In P. Lester (Ed.), *Methods in Enzymology*, **299** 152-178: Academic Press.

- Somova, L.I., Shode, F.O., Ramnanan, P. & Nadar, A. (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, **84**, 299-305.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruomab, O. I., & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, **579**, 200–213.
- Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, **327(7)**, 649-662.
- Steenvoorden, D. P. T., & Beijersbergen van Henegouwen, G. M. J. (1997). The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **41(1-2)**, 1-10.
- Su, X., Duan, J., Jiang, Y., Shi, J., & Kakuda, Y. (2006). Effects of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19(4)**, 348-353.
- Su, X., Duan, J., Jiang, Y., Duan, X., & Chen, F. (2007). Polyphenolic profile and antioxidant activities of oolong tea infusion under various steeping conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, **8(12)**, 1196-1205.
- Tabera, J., Guinda, Á., Ruiz-Rodríguez, A., Señoráns, F. J., Ibáñez, E., Albi, T., & Reglero, G. (2004). Countercurrent Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of High-Added-Value Compounds from a Hexane Extract of Olive Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(15)**, 4774-4779.
- Toyokuni, S. (1999). Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology International*, **49(2)**, 91-102.
- Trojanová, I., Rada, V., Kokoška, L., & Vlková E. (2004). The bifidogenic effect of *Taraxacum officinale* root. *Fitoterapia*, **75**, 760–763.
- Trouillas, P., Calliste, C. A., Allais, D. P., Simon, A., Marfak, A., Delage, C. & Duroux, J.L. (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*, **80**, 399–407.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Bastos, M. L. (2001). Antioxidant Activity of *Centaurium erythraea* Infusion Evidenced by Its Superoxide Radical Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49(7)**, 3476-3479.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39(1)**, 44-84.
- Velazquez, D. V. O., Xavier, H. S., Batista, J. E. M., & de Castro-Chaves, C. (2005). *Zea mays* L. extracts modify glomerular function and potassium urinary excretion in conscious rats. *Phytomedicine*, **12(5)**, 363-369.
- Vitor, R. F., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A. I., Teixeira, A. & Paulo, A. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, **93**, 363–370.

Vinson, J. A., & Dabbagh, Y. A. (1998). Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research*, **18(6)**, 1067-1075.

Wang, D., Kreutzer, D. A., & Essigmann, J. M. (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **400(1-2)**, 99-115.

Williamson, G., & Manach, C., (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81(suppl)**: 243S–245S.

Yen, G. C., & Chen, H. Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43(1)**, 27-32

Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49(11)**, 5165-5170.